

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANA MARCIA DELATTRE**

**ESTUDO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÁCIDOS GRAXOS  
POLIINSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA-3 (n-3) SOBRE ASPECTOS MOTORES  
E BIOQUÍMICOS EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON**

**CURITIBA**

**2008**

**ANA MARCIA DELATTRE**

**ESTUDO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÁCIDOS GRAXOS  
POLIINSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA-3 (n-3) SOBRE ASPECTOS MOTORES  
E BIOQUÍMICOS EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anete Curte Ferraz

**CURITIBA**

**2008**

Ao Fabrício, meu marido, que com imenso amor, passou comigo por todos os momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Aroldo e Maria Alice. Exemplos de vida, sinceridade e amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sei que estava comigo em todos os momentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anete Curte Ferraz pela oportunidade de concretizar este sonho. Pela amizade, confiança e principalmente por sua dedicação em me guiar pelo caminho científico com exímia sabedoria.

Ao Fabrício, por estar sempre ao meu lado, principalmente quando eu não tinha mais forças para continuar.

Aos meus pais Aroldo e Maria Alice, pois o orgulho que vocês sentem me estimula.

Aos meus irmãos pela paciência de ouvirem todas as minhas histórias sobre os experimentos.

À Caroline Caldeira, amiga que foi meu “braço direito e esquerdo”.

Aos amigos Mariana, César, Marcela, Karin, Giovana e Coni, que me acompanharam em todo o experimento, desde a “penosa” suplementação diária até os testes comportamentais. Vocês foram fundamentais para a conclusão desta pesquisa. Muito obrigada de coração.

Às amigas Juliana Pamplona e Renata Araújo por me ensinarem o funcionamento do laboratório e o manejo dos animais, e além disso, companheiras de muitas confidências.

À amiga e companheira de mestrado Ágata Kiss, agradeço pelo apoio durante as pesquisas e a colaboração na correção e revisão deste trabalho.

Às amigas Francesca e Vanessa que me ensinaram as técnicas experimentais utilizadas nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luis Cláudio Fernandes que permitiu a utilização dos equipamentos do seu laboratório.

Às doutorandas Katya Naliwaiko e Fabíola Iagher, pela colaboração na análise do perfil lipídico por HPLC.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Arruda e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elide Pereira dos Santos que permitiram a manutenção de nossas amostras em freezer – 70 °C.

Ao Departamento de Bioquímica pelo empréstimo de equipamentos e utilização dos laboratórios.

Ao Prof. Dr. Léder Leal Xavier, do Laboratório de Biologia Tecidual do Departamento de Ciências Morfológicas da PUC-RS e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Matilde Achaval,

do Laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde UFRGS, pela parceria e ajuda na imunohistoquímica.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janete Anselmo-Franci e ao Dr. Rafael Escorsim Szawka, do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da USP Ribeirão Preto-SP, pela colaboração na análise dos estriados.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Norma Marroni e à doutoranda Cíntia de Davi, do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia do Hospital de Clínicas da UFRGS pela atenção e disposição na análise da substância negra.

À Silvia, farmacêutica responsável pelo Laboratório Central do Departamento de Farmacologia da UFPR, sempre disposta a me esclarecer dúvidas quanto ao preparo de várias soluções utilizadas em meus experimentos.

A todos que trabalham no biotério central da UFPR, em especial ao Cândido e Luisão, pelo cuidado com os nossos animais.

À Ruth, pela dedicação ao fornecer documentos da secretaria.

À Fundação Herbarium de Pesquisa e Saúde pela gentileza na doação das cápsulas de óleo de peixe utilizadas neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma patologia neurodegenerativa caracterizada pela progressiva morte das células dopaminérgicas do sistema nigroestriatal, com conseqüente redução da concentração de dopamina no estriado, levando à manifestação de sintomas clínicos como tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e disfunção na marcha. Neste trabalho investigamos o efeito da suplementação crônica com óleo de peixe (OP), rico em ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 (n-3), sobre o comportamento motor e dosagens bioquímicas, em modelo animal de doença de Parkinson. Para isso, 4 µg de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ou 2 µL de líquido cefalorraquidiano artificial foram administrados unilateralmente ou bilateralmente, no feixe prosencefálico medial dos animais, diariamente suplementado com OP (4 g/kg/dia), a partir do 21º ao 90º dia de vida, assim como em animais controles (não suplementados). A análise do perfil lipídico, no córtex cerebral e na substância negra, realizada através de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) indicou que os suplementados com OP apresentaram incorporação do ácido graxo docosahexaenóico (DHA) em ambas as estruturas, mas não alterou o nível de peroxidação lipídica, determinado pelo método de avaliação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). No entanto, no grupo lesado, os animais controles mostraram significativo aumento nos níveis de peroxidação lipídica na substância negra comparado aos suplementados com OP, os quais mantiveram níveis similares ao grupo falso operado não suplementado. Tal efeito neuroprotetor, porém, não foi suficiente para a preservação dos neurônios dopaminérgicos, nem para sua manutenção fenotípica, uma vez que a avaliação imunohistoquímica para a enzima tirosina hidroxilase mostrou redução da densidade óptica, na substância negra parte compacta (SNpc) e na área tegmentar ventral. Além disso, a suplementação com OP não alterou a concentração de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) no estriado, depletados nos animais lesados com a neurotoxina 6-OHDA, em ambos os grupos experimentais. De acordo com os testes comportamentais, que avaliaram ambulação e tremor de mandíbula, o OP não se mostrou eficaz em minimizar os déficits motores originados da lesão no sistema nigroestriatal. Por outro lado, foi hábil em reduzir o comportamento rotacional, induzido por apomorfina, sugerindo assim, um efeito neuroprotetor sobre as discinesias, muito embora, através de mecanismos que ainda necessitam ser elucidados. Baseados no resultados acima mencionados, estudos futuros sobre ação do óleo de peixe em protocolos que mimetizem fases iniciais da doença de Parkinson fazem-se necessários.

Palavras-chave: Ácidos graxos poliinsaturados. Óleo de peixe. Doença de Parkinson. Dopamina.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative pathology characterized by progressive death of dopaminergic cells from the nigro-striatal system, with consequent reduction of dopamine concentration in the striatum, leading to the manifestation of clinical symptoms such as resting tremor, rigidity, bradykinesia, and gait dysfunction. In the present work, we investigated the effect of chronic supplementation with fish oil (FO), rich in polyunsaturated fatty acids from the omega-3 (n-3) family, on motor behavior and on biochemical dosage in an animal model of Parkinson's disease. For that matter, 4 µg of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) or 2 µL of artificial cerebrospinal fluid was unilaterally or bilaterally administered into the medial forebrain bundle of animals daily supplemented with FO (4 g/kg/day), from their 21° to their 90° day of life, as well as of control animals (not supplemented). Cerebral cortex and substantia nigra lipidic profile analysis, performed through high performance liquid chromatography (HPLC), indicated that animals supplemented with FO presented docosahexaenoic acid (DHA) incorporation in both structures but no altered lipidic peroxidation level, determined by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) assay. Nevertheless, in the lesioned group, the control animals showed significantly increased levels of lipidic peroxidation in the substantia nigra compared to the ones supplemented with FO, whose levels were similar to those of sham-operated non-supplemented animals. Such neuroprotective effect, however, was not enough for the preservation of dopaminergic neurons, neither to their phenotypical maintenance, since tyrosine-hydroxylase immunohistochemical evaluation showed reduction of optical density in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and in the ventral tegmental area. Besides that, FO supplementation did not alter the concentration of dopamine and its metabolites (DOPAC and HVA) in the striatum, depleted in animals lesioned with the neurotoxin 6-OHDA, in both experimental groups. According to the behavioral tests, which evaluated ambulation and jaw tremor, FO was not able to minimize motor deficits originated from the lesion into the nigro-striatal system. On the other hand, it was able to reduce the rotational behavior induced by apomorphine, therefore suggesting a neuroprotective effect on dyskinesias, even though the mechanisms through which it occurs still need to be elucidated. Based on the aforementioned results, future studies about the action of fish oil on protocols that simulate initial stages of Parkinson's disease are necessary.

**Keywords:** Polyunsaturated fatty acids. Fish oil. Parkinson's disease. Dopamine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	REPRESENTAÇÃO DA CADEIA CARBÔNICA DOS ÁCIDOS PRECURSORES DAS FAMÍLIAS n-6 E n-3 .....	15
FIGURA 2 -	ETAPAS BIOQUÍMICAS PARA SÍNTESE DOS ÁCIDOS GRAXOS ..	16
FIGURA 3 -	ESQUEMA REPRESENTANDO OS MECANISMOS DE AÇÃO DOS AGPIs n-3 NA FUNÇÃO CELULAR .....	20
FIGURA 4 -	PAPEL DO DHA NOS PROCESSOS BIOQUÍMICOS NO ENCÉFALO.....	22
FIGURA 5 -	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DA FAMÍLIA n-3 DURANTE O DESENVOLVIMENTO NORMAL DO ENCÉFALO HUMANO. ....	24
FIGURA 6 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA NIGROESTRIATAL ...	26
FIGURA 7 -	INTERAÇÃO SINÉRGICA DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MORTE DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS NA DOENÇA DE PARKINSON .....	28
FIGURA 8 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	36
FIGURA 9 -	CONTROLE DA MASSA CORPORAL.....	48
FIGURA 10 -	ATIVIDADE ROTACIONAL IPSILATERAL E CONTRALATERAL .....	49
FIGURA 11 -	ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS LESADOS UNILATERALMENTE .....	50
FIGURA 12 -	ATIVIDADE EXPLORATÓRIA ( <i>REARINGS</i> ) DOS ANIMAIS LESADOS UNILATERALMENTE.....	51
FIGURA 13 -	ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS LESADOS BILATERALMENTE .....	51
FIGURA 14 -	ATIVIDADE EXPLORATÓRIA ( <i>REARINGS</i> ) DOS ANIMAIS LESADOS BILATERALMENTE .....	52
FIGURA 15 -	EFEITO DA INFUSÃO BILATERAL DE 6-OHDA SOBRE O TREMOR DE MANDÍBULA.....	53
FIGURA 16 -	EFEITO DA INFUSÃO BILATERAL DE 6-OHDA NO TESTE DE CATATONIA.....	54



FIGURA 17 – CONCENTRAÇÃO ESTRIATAL DE DOPAMINA .....	58
FIGURA 18 – CONCENTRAÇÃO ESTRIATAL DE DOPAC.....	58
FIGURA 19 – EFEITO DA INFUSÃO UNILATERAL DE 6-OHDA SOBRE A CONCENTRAÇÃO ESTRIATAL DE HVA.....	59
FIGURA 20 – TAXA DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA SUBSTÂNCIA NEGRA .....	61
FIGURA 21 – EFEITO DA INFUSÃO UNILATERAL DE 6-OHDA SOBRE A DENSIDADE ÓPTICA NA SUBSTÂNCIA NEGRA .....	62
FIGURA 22 – EFEITO DA INFUSÃO UNILATERAL DE 6-OHDA SOBRE A DENSIDADE ÓPTICA NA ÁREA TEGMENTAR VENTRAL. ....	62
FIGURA 23 - IMAGEM DIGITALIZADA DA DENSIDADE ÓPTICA NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA E NA ÁREA TEGMENTAR VENTRAL .....	63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DE CÓRTEX ENCEFÁLICO .....	55
TABELA 2 –	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DE SUBSTÂNCIA NEGRA ESQUERDA .....	56
TABELA 3 –	CONCENTRAÇÃO DE DOPAMINA E SEUS METABÓLITOS NO ESTRIADO NÃO LESADO.....	57
TABELA 4 –	TAXA DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA SUBSTÂNCIA NEGRA CONTRALATERAL À LESÃO.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA - 6-hidroxidopamina  
AA - ácido aracdônico  
AGPIs - ácidos graxos poliinsaturados  
BMMC - bromometil-metoxi-coumarina  
DA - dopamina  
DAT - transportador de dopamina  
DHA - ácido docosahexaenóico  
DP - doença de Parkinson  
EPA - ácido eicosapentaenóico  
FPM - feixe prosencefálico medial  
HPLC - cromatografia líquida de alta precisão  
i.p. - intraperitoneal  
LA - ácido graxo linoléico  
LCR - líquido cefalorraquidiano  
L-DOPA/levodopa – 3,4-dihidroxifenilalanina  
LNA - ácido graxo  $\alpha$ -linolênico  
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetraidropiridina  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
NO - óxido nítrico  
 $-O_2^{\bullet -}$  - radical superóxido  
 $-OH^{\bullet}$  - íon hidroxil  
 $-ONOO^-$  - peroxinitrito  
OP - óleo de peixe  
PBS - solução salina com tampão fosfato  
ROS - espécies reativas de oxigênio  
s.c. - subcutâneo  
SNC - sistema nervoso central  
SNpc - substância negra parte compacta  
TBA - ácido tiobarbitúrico  
TBARS - substância reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TCA - ácido tricloroacético  
VTA - área tegmentar ventral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
1.1 ÁCIDOS GRAXOS	14
1.1.1 Importância biológica dos ácidos graxos poliinsaturados	17
1.1.2 Importância dos ácidos graxos poliinsaturados nas membranas neuronais e na função encefálica	20
1.1.3 Incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados no encéfalo	24
1.2 DOENÇA DE PARKINSON	25
1.2.1 Etiologia	27
1.2.2 Tratamentos farmacológicos	29
1.2.3 Modelo animal de doença de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina	29
1.3 AÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS EM NEUROPATOLOGIAS	31
<b>2 OBJETIVO</b>	33
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	34
3.1 ANIMAIS	34
3.1.1 Grupos experimentais	35
3.1.2 Drogas utilizadas	36
3.1.3 Lesão no feixe prosencefálico medial com 6-hidroxidopamina	37
3.2 OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS	38
3.2.1 Teste rotacional	38
3.2.2 Teste do campo aberto	39
3.2.3 Teste do tremor de mandíbula	39
3.2.4 Teste da catatonía	40
3.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO	40
3.4 AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA	43
3.5 ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	44
3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA	45
<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	47
<b>5 RESULTADOS</b>	48
5.1 MASSA CORPORAL	48
5.2 ANÁLISE COMPORTAMENTAL	49

5.2.1 Teste rotacional.....	49
5.2.2 Teste do campo aberto .....	50
5.2.3 Teste do tremor de mandíbula.....	52
5.2.4 Teste da catatonia .....	53
5.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO .....	54
5.4 AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA.....	56
5.5 PRODUTOS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA SUBSTÂNCIA NEGRA.....	59
5.6 IMUNOHISTOQUÍMICA .....	61
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídeos constituem um grupo de compostos que exibem diversas funções biológicas no organismo, dentre as quais se destacam as funções de reserva energética e a participação como constituinte fundamental das membranas celulares. Também desempenham papéis importantes, como agentes emulsificantes, transportadores de elétrons, mensageiros intra e extracelulares e, ainda, funcionam como âncora para as proteínas de membranas biológicas (GARRETT; GRISHAM, 1999).

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de 4 a 36 átomos de carbono que podem apresentar cadeia saturada, a qual não contém dupla ligação entre carbonos, ou cadeia insaturada, com uma ou mais duplas ligações entre carbonos. As propriedades físicas dos ácidos graxos e dos compostos que os contêm são amplamente determinadas pelo comprimento e pelo grau de insaturação da cadeia hidrocarbônica (LEHNINGER; NELSON; COX, 1998).

Assim, de acordo com o tipo de ligações presentes em cada estrutura molecular, podemos classificar os ácidos graxos como saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. A presença de insaturação na cadeia hidrocarbônica dificulta a interação intermolecular, fazendo com que, em geral, estes ácidos graxos se apresentem a temperatura ambiente no estado líquido. Já os saturados, que possuem maior facilidade desta interação, apresentam-se no estado sólido (HULBERT *et al.*, 2004).

Os lipídeos mais simples constituídos de ácidos graxos são os de reserva (triacilgliceróis), que estão presentes na maioria das gorduras naturais, como a de óleos vegetais, laticínios e gordura animal. Já os lipídeos com função estrutural são

mais complexos, e incluem os fosfolípidos que são basicamente constituídos de ácidos graxos poliinsaturados (LEHNINGER; NELSON; COX, 1998).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) podem ser subdivididos em duas famílias de acordo com a posição da primeira insaturação da cadeia carbônica em relação à extremidade metila (ômega) terminal. Os ácidos graxos pertencentes à família ômega 3 ( $\omega$ -3 ou n-3) possuem sua primeira dupla ligação no terceiro carbono a partir da extremidade metila; já os pertencentes à família ômega-6 ( $\omega$ -6 ou n-6), no sexto carbono (FIGURA 1). As diferentes posições e o número de duplas ligações conferem aos ácidos graxos diferentes propriedades químicas, nutricionais e funcionais (GARRETT; GRISHAM, 1999).

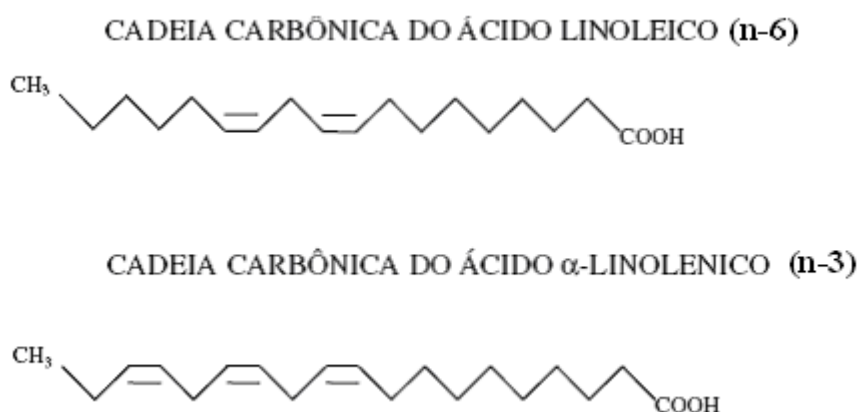


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA CADEIA CARBÔNICA DOS ÁCIDOS PRECURSORES DAS FAMÍLIAS n-6 E n-3  
 FONTE: ADAPTADO DE GARRETT; GRISHAM (1999).

Cada família é sintetizada a partir de um ácido graxo precursor específico: o ácido graxo  $\alpha$ -linolênico (18:3) e ácido graxo linoléico (18:2), que originam as famílias n-3 e n-6, respectivamente. Estes ácidos graxos são chamados de essenciais, já que os seres humanos, por não possuírem enzimas dessaturases específicas ( $\Delta$ -15 e  $\Delta$ -12 dessaturase), não têm a capacidade de biossintetizá-los, devendo, portanto, serem fornecidos pela dieta (SANGIOVANNI; CHEW, 2005;

McNAMARA; CARLSON, 2006). No organismo, estes ácidos graxos precursores, primariamente com 18 carbonos, passam por sucessivas reações de dessaturação (oxidação com formação de duplas ligações) e alongamentos (aumentos do número de carbonos na cadeia carbônica) (LAURITZEN *et al.*, 2001; MAZZA *et al.*, 2007) e, através de via metabólica, originam outros membros destas famílias (FIGURA 2).

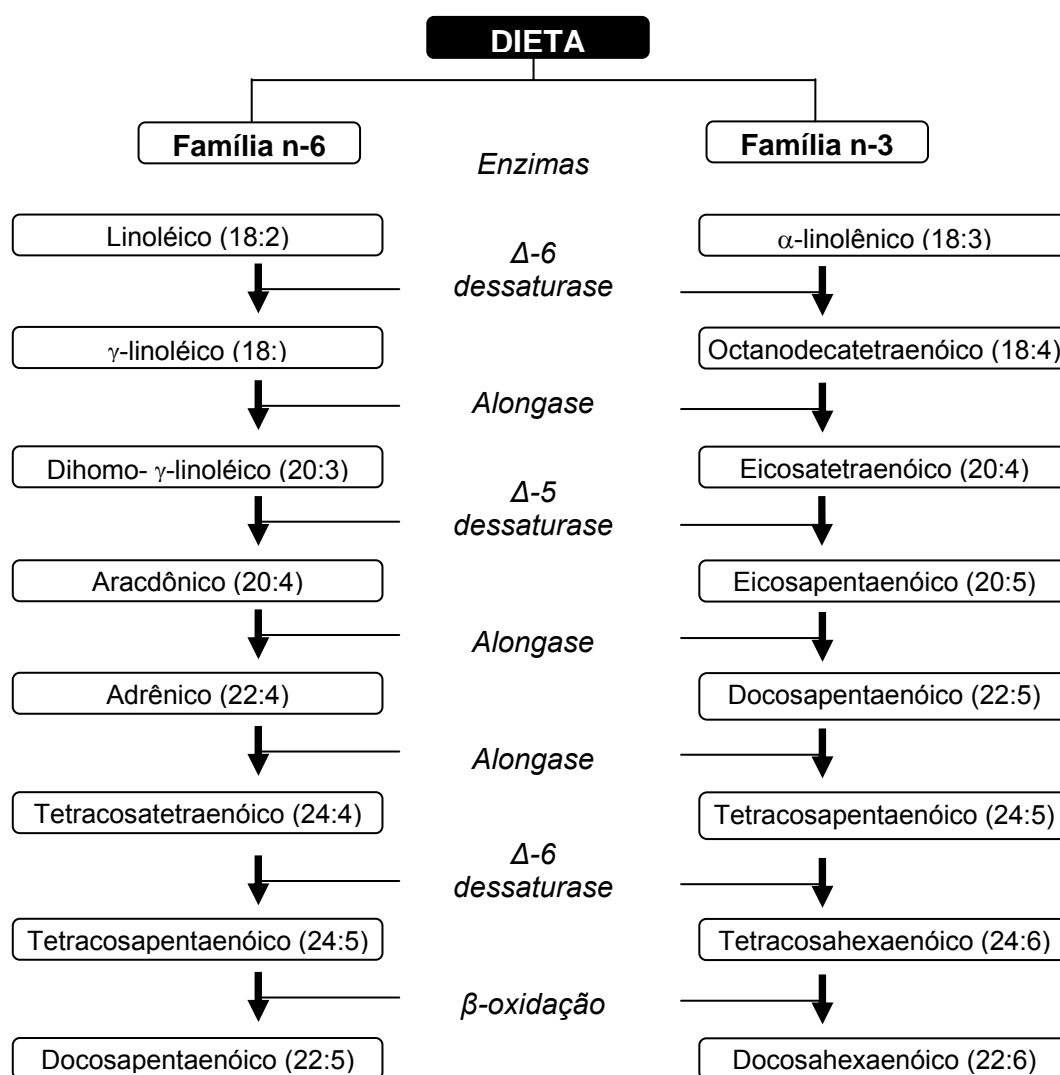


FIGURA 2 - ETAPAS BIOQUÍMICAS PARA SÍNTESE DOS ÁCIDOS GRAXOS  
FONTE: LAURITZEN *et al.* (2001)

O ácido graxo linoléico (LA) pode ser encontrado em grande abundância em sementes de plantas oleaginosas como soja, milho e girassol (SANGIOVANNI;



CHEW, 2005). Já o ácido graxo  $\alpha$ -linolênico (LNA) tem como principais fontes plantas e animais marinhos, principalmente o fitoplâncton, as algas e os peixes. O fitoplâncton, que constitui a base da cadeia alimentar nos oceanos, sintetiza os ácidos docosapentaenóico e docosaheptaenóico, os quais são encontrados em grande concentração em peixes de águas frias e profundas. Além disto, o ácido graxo precursor da família n-3 também podem ser encontrado nos óleos vegetais de linhaça e canola (HULBERT *et al.*, 2004).

#### 1.1.1 Importância biológica dos ácidos graxos poliinsaturados

Por volta de 1920, alguns autores correlacionaram o efeito proveniente da redução da ingestão de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) com o aparecimento de distúrbios como dermatites, mudanças na acuidade visual, retardo no crescimento e falhas na reprodução. Mas foi a partir da década dos anos 40 que se iniciaram pesquisas mais aprofundadas e, conseqüentemente, com o aumento da fundamentação fisiológica, pode-se atribuir funções biológicas mais específicas aos ácidos graxos (MACLEAN *et al.*, 2005).

Existem evidências de que a distribuição dos AGPIs seria modulada pela dieta (HULBERT *et al.*, 2004), e que manipulações alimentares influenciariam propriedades diretamente reguladas por estes ácidos graxos (CLARKE *et al.*, 2005). Simopoulos (2002) mostra a diferenciação das dietas ao longo dos tempos e seu impacto nas funções biológicas e metabólicas, associando-a com implicações para a saúde quando há um desequilíbrio quantitativo na ingestão de ácidos graxos n-3 e n-6 na dieta humana.

Na atualidade, são enumeradas várias funções importantes aos AGPIs, dentre as quais podemos destacar a participação na composição das membranas celulares (HÖGYES *et al.*, 2003; HICHAMI *et al.*, 2007; SUMIYOSHI *et al.*, 2008), a

modulação da expressão gênica (HORROCKS; FAROOQUI, 2004; MAZZA *et al.*, 2007), o envolvimento nos processos de transdução de sinais (FARKAS *et al.*, 2002; McNAMARA; CARLSON, 2006), a geração de segundos mensageiros e regulação de canais iônicos e receptores (FAROOQUI; HORROCKS; FAROOQUI, 2000), a redução da agregação plaquetária (CLARKE *et al.*, 2005), geração de eicosanóides (CLARKE *et al.*, 2005; MAZZA *et al.*, 2007) e sua importância no desenvolvimento neuronal (LEVANT; RADEL; CARLSON, 2004).

O LNA e o LA participam como precursores de substâncias fisiologicamente ativas chamadas eicosanóides, fatores autócrinos ou parácrinos altamente bioativos, que podem ser subdivididos em três classes: as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos (ANDRADE; CARMO, 2006). Os substratos para a formação dos eicosanóides são o ácido aracdônico (AA), o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico, os quais, uma vez formados, atuam regulando alguns aspectos funcionais da célula, incluindo respostas vasculares, imunológicas e inflamatórias (YOUDEM; MARTIN; JOSEPH, 2000).

Na síntese destes compostos bioativos, o ácido graxo precursor é clivado por ação de fosfolipases, para ser então metabolizado. Existem duas vias de metabolização: a via ciclooxigenase, para formação de prostaglandinas e tromboxanos, e a via lipooxigenase, a qual leva à síntese de leucotrienos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1998). Embora o AA seja preferencialmente metabolizado pela via da ciclooxigenase, a presença do EPA inibe competitivamente esta via. Por exemplo, a ingestão aumentada de AGPIs n-3, resulta na diminuição plasmática de AA (ANDRADE; CARMO, 2006). Conseqüentemente, sua disponibilidade e taxa de renovação (*turnover*) pela ciclooxigenase estão diminuídos, resultando na menor formação de derivados do AA, aumentando desta forma as prostaglandinas e tromboxanos derivados do EPA. A grande importância deste fato se dá não só pela alteração das concentrações de tais compostos, mas também pela diferença em suas atividades biológicas, pois os eicosanóides derivados do EPA têm menor potencial inflamatório quando comparados aos que são derivados do AA

(FEDOROVA; SALEM Jr, 2006). Desse modo, as quantidades relativas das duas famílias de ácidos graxos providas pela dieta e presentes nos tecidos são de grande importância.

Como já mencionado anteriormente, ácidos graxos também desempenham papel crucial na composição estrutural das membranas celulares, que são formadas por várias classes de lipídeos, dos quais os mais abundantes são os glicerofosfolipídeos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1998). Segundo Farooqui, Horrocks e Farooqui (2000) os glicerofosfolipídeos não possuem somente um papel importante na determinação das propriedades físicas da bicamada, como espessura, área por molécula e domínios laterais, mas também desempenham muitas outras funções básicas, pois proporcionam às membranas estabilidade, fluidez e permeabilidade, além de serem requeridos nas funções de proteínas integrais de membrana, receptores e canais iônicos.

Embora o mecanismo molecular de atuação do ácido docosahexaenóico (DHA) sobre os canais iônicos não esteja completamente elucidado, segundo Horrocks e Farooqui (2004) pela facilitação das respostas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e pelo bloqueio dos canais de potássio, o DHA pode aumentar a excitabilidade dos neurônios e facilitar sua atividade. Por outro lado, pode estabilizar as membranas neuronais pela supressão dos canais de cálcio e sódio voltagem-dependentes, inibindo assim repetitivos disparos de potenciais de ação despolarizantes (ITOKAZU *et al.*, 2000).

Recentemente, estudos demonstraram que os AGPIs n-3, principalmente o DHA, participam diretamente da modulação da expressão gênica em processos que envolvem estresse oxidativo, sinalização e divisão celular, crescimento e apoptose (SIMOPOULOS, 2006; YAVIN, 2006). Horrocks e Farooqui (2004) também citam que o DHA afeta a expressão gênica e a estabilidade do RNA mensageiro por várias enzimas lipogênicas. Nesta situação, o DHA atua como um hormônio que controla a atividade dos fatores de transcrição de genes, na transdução de sinal, na formação

de canais iônicos e no metabolismo de proteínas reguladoras (KITAJKA *et al.*; 2002) (FIGURA 3).

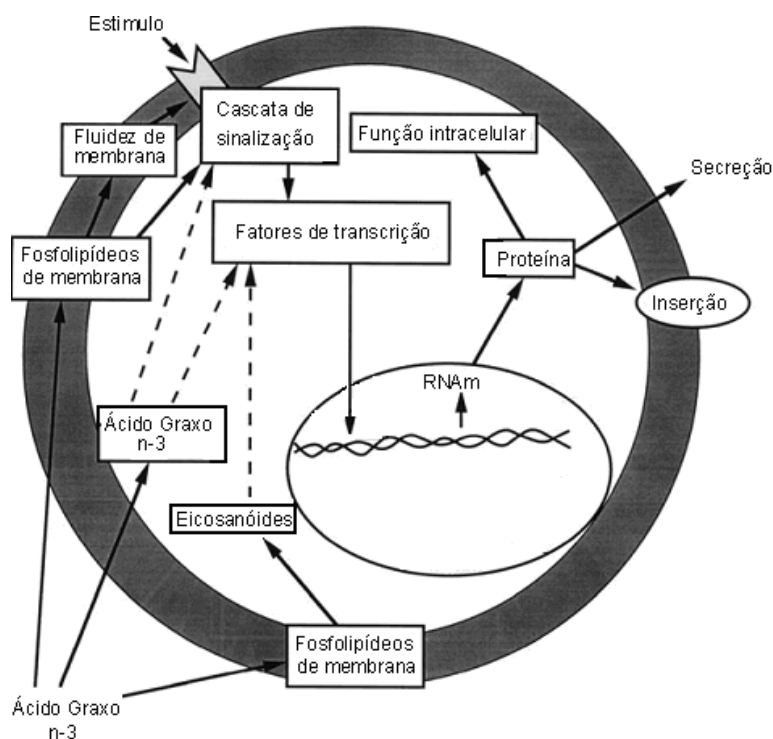


FIGURA 3 - ESQUEMA REPRESENTANDO OS MECANISMOS DE AÇÃO DOS AGPIs n-3 NA FUNÇÃO CELULAR  
 FONTE: ADAPTADO DE CALDER (1998)

### 1.1.2 Importância dos ácidos graxos poliinsaturados nas membranas neuronais e na função encefálica

O sistema nervoso central (SNC) é único quando comparado a outros tecidos, porque ele não utiliza para incorporação nas membranas neuronais, o LNA e LA, mas apenas seus produtos de dessaturação e alongamento, como DHA, EPA e AA (DAS; VADDADI, 2004; MAZZA *et al.*, 2007). Assim, os AGPIs n-3 quando incorporados às membranas dos neurônios, podem alterar suas características físico-químicas, além de participarem ativamente de processos de sinalização celular (HICHAMI *et al.*, 2007), na condução ou transmissão dos impulsos nervosos

(FARKAS *et al.*, 2002), na regulação da atividade enzimática e apoptose (YOUDIM; MARTIN; JOSEPH, 2000). São capazes também de facilitar a formação de espinhos dendríticos e crescimento neuronal (WAINWRIGHT *et al.*, 1998; MAZZA *et al.*, 2007), e sua deficiência pode marcadamente afetar atividades enzimáticas, de canais iônicos, receptores  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, proteína quinase C e outras enzimas relacionadas com a transdução de sinais, além de resultar em mudanças na afinidade dos receptores neurais à agonistas, neurotransmissores e fatores de crescimento (HORROCKS; FAROOQUI, 2004) (FIGURA 4).

No encéfalo adulto, os lipídeos correspondem a aproximadamente 50-60% do seu peso seco (YOUNG; MARTIN, 2003), sendo que 21 a 36% destes, são classificados como AGPIs (LAURITZEN *et al.*, 2001).

O DHA é um dos maiores representantes dos AGPIs n-3 no encéfalo, e representa aproximadamente 12 a 16% do total de ácidos graxos presentes (CALON; COLE, 2007). É amplamente encontrado nas membranas sinaptossomais, vesículas sinápticas e cones de crescimento (HORROCKS; FAROOQUI, 2004), e é de grande importância na regulação da função cerebral. Porém, a composição lipídica das membranas neuronais varia de acordo com a área cerebral (McNAMARA; CARLSON, 2006) e também com a disponibilidade de ácidos graxos na dieta. Como o DHA é obtido a partir do LNA, ou diretamente da alimentação, quantidades inadequadas deste ácido graxo nos períodos de formação e amadurecimento do SNC, podem resultar em prejuízos da função cognitiva e déficit da função neural (MORIGUCHI; GREINER; SALEN Jr, 2000; McNAMARA; CARLSON, 2006).

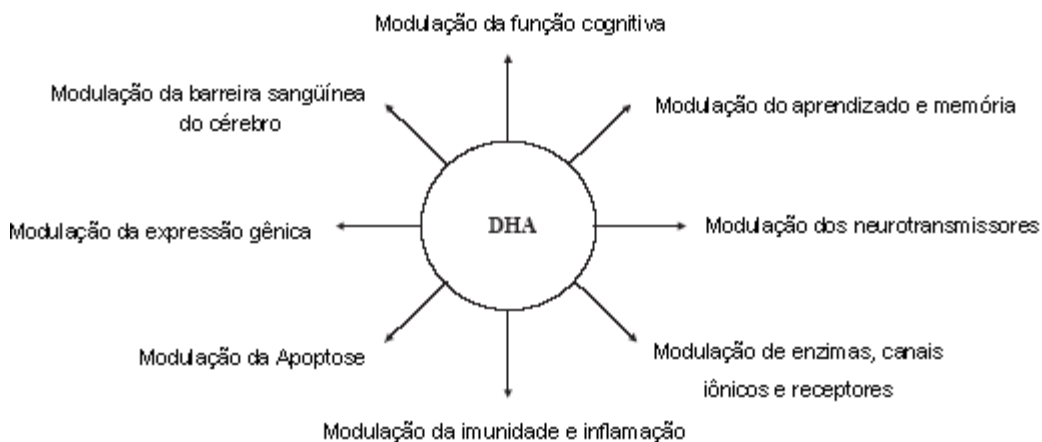


FIGURA 4 - PAPEL DO DHA NOS PROCESSOS BIOQUÍMICOS NO ENCÉFALO  
 FONTE: HORROCKS e FAROOQUI (2004)

Utilizando-se de estudos de comportamento, ensaios *in vivo* ou *in vitro*, muitos pesquisadores têm investigado quais as relações entre as quantidades de AGPIs n-3 disponíveis na dieta e a síntese e a liberação de neurotransmissores (ZIMMER *et al.*, 2000; KODAS *et al.*, 2002). Tem-se aventado a hipótese de estreita relação entre os processos bioquímicos de síntese e liberação de neurotransmissores estarem diretamente ligados aos estoques de ácidos graxos disponíveis na dieta, na ocasião da formação do SNC (FERNSTROM, 1999). Trabalhos envolvendo alteração nas composições lipídicas das dietas de ratas durante a gestação ou lactação mostraram importantes mudanças nas taxas de crescimento das células nervosas dos filhotes e nas quantidades de dopamina (DA) e metabólitos na fenda sináptica (INNIS, 2000) além de prevenção de psicopatologias na idade adulta (FERRAZ *et al.*, 2008b).

A deficiência de AGPIs n-3 pode estar associada a déficits no aprendizado, na habilidade sensorial e motivacional (ZIMMER *et al.*; 2000). Para Levant, Radel e Carlson (2004), ratos com fornecimento de baixos níveis de DHA durante o desenvolvimento tiveram alterações dos sistemas dopaminérgicos mesocortical e

mesolímbico. No entanto, o sistema nigroestriatal aparentemente permaneceu com conteúdo normal de DA, receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> e transportador de DA.

Outros neurotransmissores também podem ser afetados pelos AGPIs n-3. Horrocks e Farooqui (2004) descrevem que os conteúdos de colina e acetilcolina aumentaram 40% em ratos suplementados com estes ácido graxos, quando comparados aos ratos controles. Os autores também citam que o DHA modula a resposta GABA e pode afetar a neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica, o que por sua vez pode ter um efeito benéfico no comportamento e na função cerebral.

Estudos antropológicos, nutricionais e genéticos indicam que houve mudança acentuada na dieta humana, especialmente nos últimos 150 anos. Após a revolução industrial, a tecnologia dos alimentos e o agronegócio alavancaram as mudanças no tipo de suprimento nutricional ingerido na dieta humana (SIMOPOULOS, 2002). Estima-se que na década dos anos 80, nos Estados Unidos, a média de ingestão diária de EPA e de DHA era respectivamente de 50 mg/pessoa e 80 mg/pessoa (SIMOPOULOS, 2006), muito abaixo das doses recomendadas na literatura, que variam de aproximadamente 220 mg de EPA e DHA, segundo Mazza *et al.* (2007), e de 900 mg de EPA e 400 mg de DHA segundo Youdim, Martin e Joseph (2000).

Estes dados nos mostram que a dieta ocidental é deficiente em AGPIs n-3 quando calculada a proporção n-6/n-3. Valores que deveriam estar em índices 1/1, apresentam-se como 15/1 ou até mesmo até 16,7/1 (SIMOPOULOS, 2006). Como um balanço na proporção n-6/n-3 é crucial para o funcionamento das membranas neuronais (FARKAS *et al.*, 2002), esta alteração da dieta está intimamente relacionada com modificações na composição lipídica das membranas celulares e, conseqüentemente, com possíveis prejuízos da função neural, tais como o surgimento de diferentes neuropatologias e distúrbios cognitivos (SHAPIRO, 2003).

### 1.1.3 Incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados no encéfalo

Em humanos, o suporte de crescimento encefálico ocorre do terceiro trimestre gestacional até 18 meses após o nascimento (FIGURA 5). Apesar de a neurogênese estar presente da 14<sup>a</sup> a 25<sup>a</sup> semana gestacional, a sinaptogênese, assim como a mielinização, provavelmente coexistam em fases mais tardias (LAURITZEN *et al.*, 2001; McNAMARA; CARLSON, 2006).

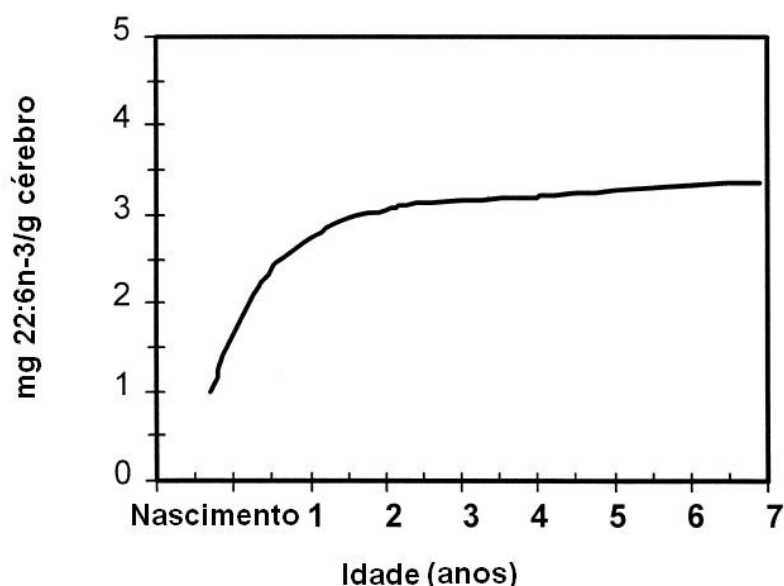


FIGURA 5 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DA FAMÍLIA n-3 DURANTE O DESENVOLVIMENTO NORMAL DO ENCÉFALO HUMANO.

FONTE: LAURITZEN *et al.* (2001)

Para Högyes *et al.* (2003), durante o desenvolvimento neuronal o cone de crescimento é especialmente enriquecido com DHA, e o crescimento axonal requer um suporte deste AGPI. Neste sentido, Horrocks e Yeo (1999) demonstraram que crianças com redução nutricional de AGPIs n-3 podem apresentar déficit na habilidade de aprendizagem, já que o DHA está envolvido na sinalização celular. Além disso, McNamara e Carlson (2006) demonstraram que a privação de n-3, na formação do SNC, pode levar ao aparecimento de neuropatologias como déficits



cognitivos, aumento do risco da criança ou adolescente ter déficit de atenção (doença de hiperatividade), ou ainda esquizofrenia.

Para Levant, Radel e Carlson (2004), a inadequada incorporação do DHA no encéfalo durante o desenvolvimento pode, quando combinada com fatores genéticos e/ou epigenéticos, contribuir para o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas. Assim, tem sido proposto um papel para os AGPIs n-3 sobre a plasticidade sináptica e o desenvolvimento do SNC, uma vez que a arquitetura plástica das sinapses cerebrais nas redes neurais constitui-se no substrato para o ideal funcionamento do SNC e regulação de suas ações sobre o organismo e eventos fisiológicos.

## 1.2 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva, com prevalência estimada em 1 a 3 % na população mundial com idade superior a 55 anos (EMBORG, 2004; PRZEDBORSKI, 2005). Inicialmente descrita em 1817 por James Parkinson em sua publicação “Ensaio sobre a paralisia agitante” (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003), é caracterizada por sinais motores como acinesia, bradicinesia, rigidez do tônus muscular, decréscimo dos reflexos posturais, tremor de repouso e distúrbios na marcha (HOWELLS *et al.*, 2005).

Paralelamente aos sintomas motores, os portadores desta doença podem apresentar manifestações não motoras, tais como comprometimento da memória (COUSINS *et al.*, 2000; HOWELLS *et al.*, 2005), distúrbios cognitivos e do sistema nervoso autônomo (DIAZ *et al.*, 2001), alterações do sono (GARCIA-BARREGUERO; LARROSA; BRAVO, 2003) e depressão (DA SILVA *et al.*, 2008).

A anormalidade bioquímica fundamental encontrada na DP é o déficit na quantidade de DA no encéfalo, atribuída à perda dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Esta via é composta por neurônios cujos corpos celulares estão

localizados na substância negra parte compacta (SNpc) e que projetam seus axônios para o caudado-putâmen, ou corpo estriado (BOVÉ *et al.*, 2005) (FIGURA 6). A redução destes neurônios, que normalmente contêm neuromelanina, produz a despigmentação da SNpc (DAUER;PRZEDBORSKI, 2003) e, associado a este fato, um dos achados fisiopatológicos mais frequentes na DP é a presença de inclusões citoplasmáticas chamadas de corpos de Lewy, formados principalmente pelas proteínas  $\alpha$ -sinucleína e ubiquitina (EMBORG, 2004).

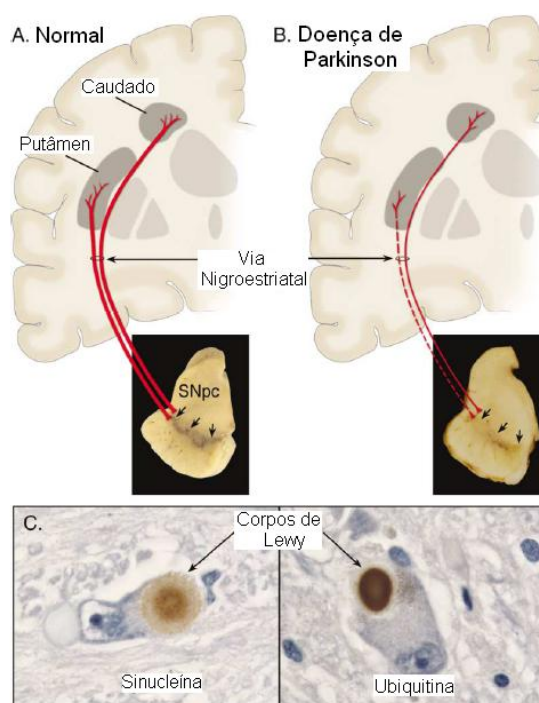


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA NIGROESTRIATAL NORMAL (A) E NA DOENÇA DE PARKINSON (B). (C) DETALHE DAS INCLUSÕES CITOPLASMÁTICAS (CORPOS DE LEWY)  
 FONTE: DAUER e PRZEDORSKI (2003)

Sob o aspecto neuroquímico, a redução do número de neurônios da via dopaminérgica nigroestriatal leva à intensa redução dos níveis de DA no estriado (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003), ocasionando o aparecimento dos sintomas característicos da doença. Correlações entre análises clínicas e bioquímicas mostram que estes sintomas aparecem quando a redução neuronal excede

aproximadamente 50%, e quando os níveis estriatais de DA são depletados em aproximadamente 80% ou mais (DEBEIR *et al.*, 2005).

No entanto, anormalidades histopatológicas podem ser encontradas em outros grupos de células dopaminérgicas e não dopaminérgica (OBESO; OLANOW; NUTT, 2000; BOVÉ *et al.*, 2005). A redução neuronal pode estar presente em outras estruturas, tais como área tegmentar ventral (VTA), *locus coeruleus*, núcleo motor dorsal do vago e núcleo basal de Meynert (LIMONGI, 2003; SHAPIRA *et al.*, 2006).

### 1.2.1 Etiologia

Embora a etiologia da DP ainda permaneça desconhecida, dados originados nas últimas décadas por estudos clínicos, autópsias e experimentos *in vivo* e *in vitro*, têm possibilitado ampliação do entendimento sobre sua patogênese. Sabe-se que a redução das células dopaminérgicas pode estar associada a diferentes mecanismos, incluindo excitotoxicidade, distúrbio homeostático do cálcio, inflamação, apoptose e agregação de proteínas (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; EMBORG, 2004; ESPOSITO *et al.*, 2007).

Outra possibilidade para a causa da doença é o fator genético, no qual genes como parkina, ou ainda mutações em  $\alpha$ -sinucleína, podem estar envolvidos (HOWELLS *et al.*, 2005). Entretanto, para Hald e Lotharius (2005), em apenas 5 a 10% dos casos observam-se correlações entre a ocorrência da doença e mutações, o que constitui a forma familiar da doença, que geralmente acomete os indivíduos ainda na juventude.

A descoberta, no início dos anos 80, do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) como um composto capaz de produzir um quadro clínico semelhante ao da DP (BOVÉ *et al.*, 2005) motivou estudos que correlacionavam esta doença com tóxicos ambientais.

Além disso, fatores endógenos que pudessem estar ligados à sua etiopatogênese também foram pesquisados (ESPOSITO *et al.*, 2007). O papel da mitocôndria na DP adquiriu relevância após a observação de que toxinas que induzem a doença podem resultar na ação inibitória da atividade do complexo I mitocondrial (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). O declínio moderado na atividade deste complexo não pode ser considerado como único responsável na etiologia da patologia, porém esta disfunção pode contribuir para uma cascata de danos que gera extensa morte celular (DUNNETT; BJÖRKLUND, 1999). Neste sentido, a inibição do complexo I aumenta a produção de radical superóxidos ( $-O_2^{\bullet}$ ), que formam radicais hidroxil ( $-OH^{\bullet}$ ) ou reagem com o óxido nítrico (NO) formando peroxinitritos ( $-ONOO^-$ ). Estes causam danos celulares por reagirem com ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Alguns autores sugerem envolvimento de vários fatores que podem interagir e provocar a morte dos neurônios da SNpc. Portanto, sugere-se que a degeneração neuronal não resulte apenas da ação de um único fator deletério, mas da convergência de diversos fatores patogênicos (FIGURA 7).

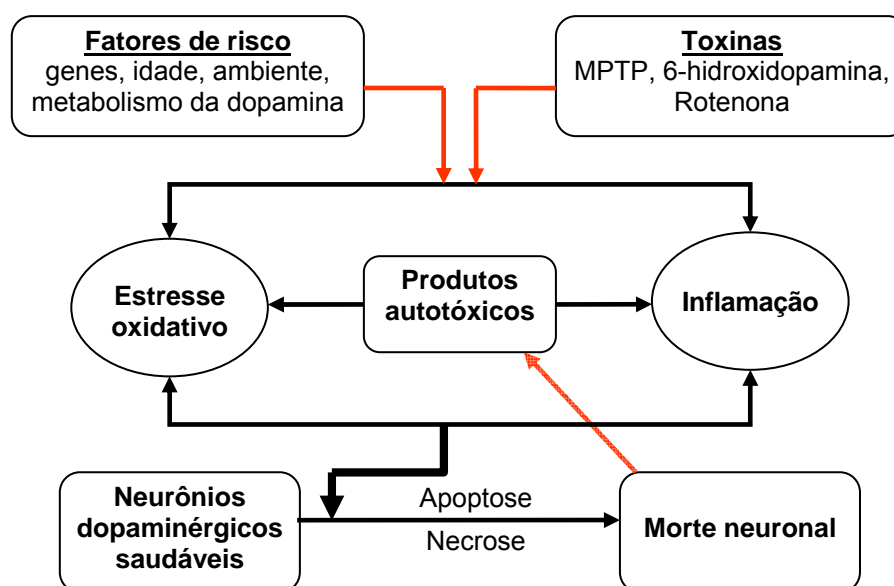


FIGURA 7 - INTERAÇÃO SINÉRGICA DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MORTE DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS NA DOENÇA DE PARKINSON  
FONTE: ADAPTADO DE ESPOSITO *et al.* (2007)

### 1.2.2 Tratamentos farmacológicos

A estratégia inicial mais utilizada para o tratamento da sintomatologia da doença são drogas anticolinérgicas (BARBOSA 2003). No entanto, segundo Shapira *et al.* (2006), embora estas drogas possuam algum efeito benéfico, estão associadas a diversas alterações cognitivas como efeito colateral.

A reposição de DA através da administração do precursor dopaminérgico 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA; levodopa) foi introduzida em 1967 por George Cotzias (HOWELL *et al.*, 2005), e permanece até os dias atuais como a droga mais utilizada no tratamento sintomático da DP (SAMADI *et al.*, 2006). Embora seja considerada a droga mais efetiva no controle dos sintomas da doença, a levodopa é responsável pelo aparecimento de diversas complicações motoras, particularmente as discinesias (WINKLER *et al.*, 2002; JULIEN *et al.*, 2006; SAMADI *et al.*, 2006), movimentos anormais e involuntários, usualmente do tipo coreiforme, que consistem em distonia, mioclonias e estereotipias (BENDIR *et al.*, 2006). Segundo Obeso, Olanow e Nutt (2000), após aproximadamente 5 anos de tratamento com levodopa, mais de 50% dos pacientes apresentam flutuações motoras e discinesias, e para Cardoso (2003), em 10 anos de tratamento, 100% dos pacientes apresentarão esta sintomatologia.

Por esse motivo, há um grande interesse em tratamentos não-dopaminérgicos para a melhora das funções motoras sem o risco do aparecimento das complicações associadas à utilização da levodopa, sendo que já existem vários grupos de drogas que são promissoras como neuroprotetoras (SHAPIRA *et al.*, 2006).

### 1.2.3 Modelo animal de doença de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina

Modelos animais são de grande valia no meio científico pois refletem características da doença, simulando alterações patológicas, histológicas e

bioquímicas, bem como seus distúrbios funcionais. Como a DP não se manifesta espontaneamente em animais, estas alterações somente são observadas quando há aplicação de agentes neurotóxicos, como por exemplo, a 6-hidroxidopamina, rotenona ou MPTP (DÍAZ *et al.*, 2001).

A 6-hidroxidopamina (2,4,5-trihidroxifeniletilamine; 6-OHDA) foi o primeiro componente descoberto na indução da morte seletiva de células catecolaminérgicas (EMBORG, 2004), há aproximadamente 30 anos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Desde então, é usada exaustivamente em modelos de DP (BOVÉ *et al.*, 2005) em espécies como camundongos, ratos, gatos, cachorros, e primatas não-humanos.

A 6-OHDA exibe alta afinidade por transportadores catecolaminérgicos da membrana plasmática, como o transportador de DA (DAT), e transportador de norepinefrina (EMBORG, 2004). Conseqüentemente, pode tanto causar danos nos neurônios dopaminérgicos, quanto nos noradrenérgicos, no sistema nervoso periférico e central (BOVÉ *et al.*, 2005).

É descrito na literatura que a 6-OHDA pode atuar diretamente na mitocôndria prejudicando a cadeia respiratória pela inibição do complexo I, o que contribui para o aumento na habilidade da neurotoxina produzir as espécies reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, gerar estresse oxidativo (SÁNCHEZ-IGLESIAS *et al.*, 2007). Subseqüente ao estresse oxidativo, poderá ocorrer peroxidação lipídica, danos no DNA e desorganização do citoesqueleto celular (BLUM *et al.*, 2001).

Como a neurotoxina é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, em modelos experimentais, a 6-OHDA é diretamente injetada através de cirurgia estereotáxica no estriado, na SNpc ou no feixe prosencefálico medial (FPM) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Passadas 24 horas da injeção da droga há início da morte neuronal, sendo que os níveis máximos de redução de DA estriatal são atingidos entre 3 a 4 dias após a lesão (BOVÉ *et al.*, 2005). Para Sánchez-Iglesias *et al.* (2007), o modelo experimental induzido por 6-OHDA é amplamente utilizado para investigar os mecanismos moleculares envolvidos na DP e para testar novas estratégias de proteção dos neurônios dopaminérgicos.

### 1.3 AÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS EM NEUROPATOLOGIAS

Como alterações nos conteúdos de AGPIs nas membranas levam a prejuízo da função neuronal (YODIM; MARTIN; JOSEPH, 2000; SHAPIRO, 2003), há interesse em desvendar qual é o papel dos AGPIs no tratamento de neuropatologias como doença de Alzheimer (CALON; COLE, 2007; CHIU *et al.*, 2008), esquizofrenia (McNAMARA; CARLSON, 2006), isquemias, epilepsias (BLONDEAU *et al.*, 2002) e depressão (ROSS, 2007; DA SILVA *et al.*, 2008).

De acordo com Youdim, Martin e Joseph (2000) no envelhecimento e em desordens neurodegenerativas, tais como a DP e a doença de Alzheimer, há freqüentemente declínio nos AGPIs, o que contribui para o decréscimo nas sinapses e na redução na função cerebral. Neste sentido, estudos epidemiológicos demonstraram que uma dieta carente em AGPIs n-3 é um fator de risco para o aparecimento da doença de Alzheimer e que esta diminuição é correlacionada com declínio cognitivo e demência (CALON *et al.*, 2005; CALON; COLE, 2007).

Ampliando estes conhecimentos, em estudos que tiveram o intuito de fornecer um suporte complementar de AGPIs, os autores demonstraram efeito neuroprotetor destes ácidos graxos em diversas neuropatologia. Para Das e Vaddadi (2004) pacientes portadores da doença de Huntington que foram tratados com DHA e EPA, apresentaram melhora clínica nas performances cognitivas e motoras, além de redução da atrofia cerebral tipicamente encontrada nesta patologia. Na esclerose múltipla, o DHA e o EPA também foram eficazes em gerar benefícios clínicos observados na escala de avaliação física e na qualidade de vida (WEINSTOCK-GUTTMAN *et al.*, 2005).

Entretanto, estudos epidemiológicos que fazem associação entre DP e dieta com AGPIs investigam, geralmente, a quantidade de gordura total ingerida através da análise de dados retrospectivos e aplicação de questionários (JOHNSON *et al.*, 1999). Em trabalho realizado por De Lau *et al.* (2005), estes autores encontraram

correlação inversamente proporcional entre utilização de dieta rica em AGPIs e aparição de DP. Entretanto, tais autores não fizeram associação direta entre AGPIs n-3 e o risco de desenvolvimento da doença.

Em estudo recente, Bousquet *et al.* (2008) demonstraram, através de modelo animal de DP induzido por MPTP, que a dieta enriquecida com AGPIs n-3 teve efeito neuroprotetor nos aspectos quantitativos de DAT, DA e seu metabólito DOPAC, bem como no número de neurônios tirosina hidroxilase (TH) positivos presentes na SNpc.

Relacionando a eficiência dos AGPIs n-3 com a sintomatologia apresentada na DP, pesquisa realizada recentemente em nosso laboratório demonstrou, através de estudo com 29 pacientes parkinsonianos que apresentavam sintomas de depressão, que a ingestão diária de óleo de peixe, rico em n-3, durante 3 meses foi eficiente na redução dos sintomas depressivos (DA SILVA *et al.*, 2008).

Apesar de vasta literatura indicar o benefício proporcionado pelos AGPIs n-3 em doenças neurológicas, existe poucos estudos que correlacionam seu efeito na sintomatologia da DP. Assim, como estes ácidos graxos são necessários para o conveniente desenvolvimento do encéfalo e de suas funções, sua correlação com a DP poderá ser a descoberta de uma nova estratégia neuroprotetora, que consiste em reduzir as manifestações clínicas da doença e/ou retardar a sua progressão, para trazer aos portadores desta patologia melhora na qualidade e na expectativa de vida.



## 2 OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi investigar o efeito da suplementação crônica com óleo de peixe, rico em ácidos graxos da família n-3, no período pós desmame (21 dias) até a idade adulta (90 dias), em modelo animal da DP induzido por 6-OHDA.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a função motora através dos testes de campo aberto, rotação, catatonía e tremor de mandíbula em animais cronicamente suplementados e animais controle;
- Avaliar o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre as concentrações de dopamina e seus metabólitos presentes no estriado em animais cronicamente suplementados e controles;
- Determinar o perfil lipídico da substância negra e córtices cerebrais em animais cronicamente suplementados e controles;
- Mensurar os produtos de peroxidação lipídica na substância negra em animais cronicamente suplementados e controles;
- Quantificar através de técnica de imunohistoquímica a densidade óptica na substância negra parte compacta e na área tegmentar ventral em animais cronicamente suplementados e controles.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, obtidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. A partir do 21º dia de vida, os animais foram mantidos em caixas coletivas (60 x 25 x 15 cm), nas quais foram colocados 5 ratos. O sepilho foi trocado em dias alternados e os animais receberam água e alimentação (ração Nuvilab CR<sub>1</sub> – Nuvital Nutrientes S/A) à vontade. Foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes às 10:00 horas) e em ambiente climatizado com  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Os animais foram pesados em balança digital, marca GEHAKA modelo BG-4001, em dias alternados, para acompanhamento da curva de evolução da massa corpórea.

Todos os cuidados foram tomados no intuito de minimizar o número de animais utilizados ao longo do experimento sem, no entanto, comprometer a análise estatística dos resultados. Além disso, esforços máximos foram tomados para reduzir eventuais desconfortos causados aos animais durante os experimentos, demonstrando preocupações que se adaptam às modernas práticas bioéticas de experimentação animal. Todos os experimentos contidos nesta pesquisa seguiram as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o número 0176.

### 3.1.1 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais:

#### A) Óleo de Peixe (OP) N=65:

Neste grupo, os animais receberam diariamente, a partir do 21º dia ao 90º dia de vida, 4,0 g/kg/dia de composto de extrato marinho enriquecido com AGPIS n-3, contendo 120 mg de DHA e 180 mg EPA e antioxidante tocoferol, administrado via oral, com pipeta automática de volume ajustável (Gilson, France). As cápsulas contendo estes ácidos graxos foram cedidas pela Fundação Herbarium de Saúde e Pesquisa S/A.

#### B) Grupo Controle (C) N=64:

Neste grupo, os animais não receberam suplementação com óleo de peixe, alimentados apenas com ração própria para ratos (acima especificada) e água à vontade, durante o mesmo período.

Aos 90 dias de vida, os animais dos grupos OP e C foram subdivididos em três subgrupos de acordo com o procedimento cirúrgico (FIGURA 8) abaixo discriminado:

1) Lesado (6-OHDA): subgrupo no qual animais receberam a administração de 4 µg da neurotoxina 6-OHDA no feixe prosencefálico medial (FPM), uni ou bilateralmente.

2) Falso operado (Sham): no qual os animais receberam a injeção de líquido cefaloraquidiano (LCR) artificial, uni ou bilateralmente, sem a adição de 6-OHDA, no mesmo volume que o operado.

3) Não-lesado (NL): no qual os animais não receberam intervenção cirúrgica.

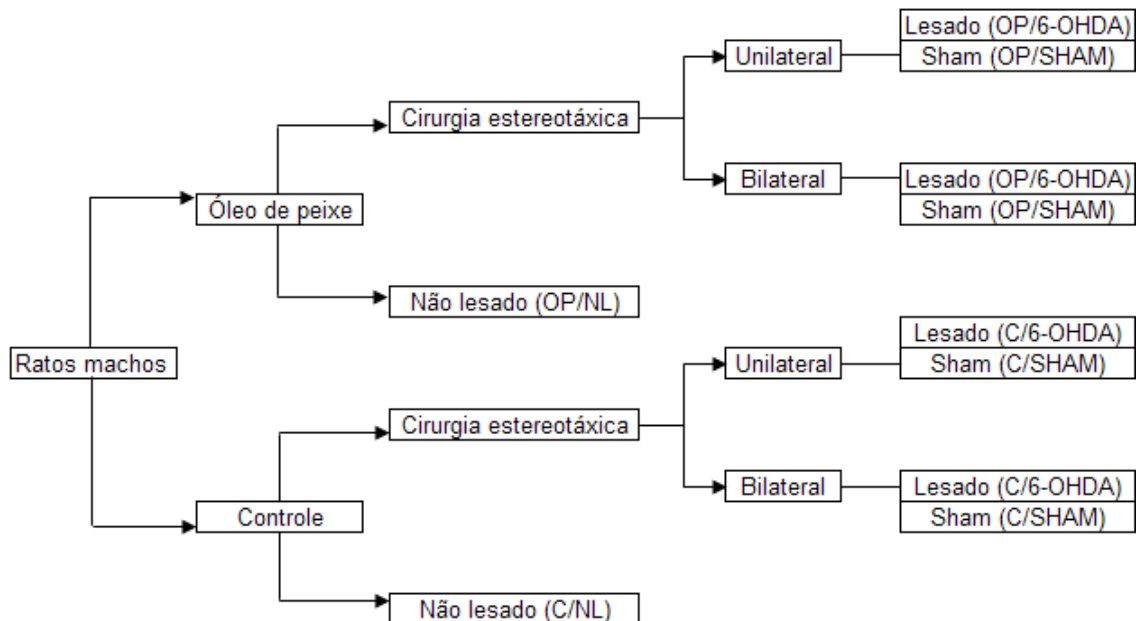


FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

### 3.1.2 Drogas utilizadas

- Anestésico Equitesin (i.p.) (tiopental 1%; 4,25% hidrato de cloral; 2,13% sulfato de magnésio; 42,8% propilenoglicol e 3,7% etanol em água) na dose 0,3 mL/100 g animal.
- Benzilpenicilina potássica (I.M.) 5.000.000 U diluída em 5 mL de água destilada, na dose 0,1 mL, imediatamente após a cirurgia.
- Cloranfenicol em pó, aplicado sobre a cirurgia, antes da síntese.
- 6-hidroxidopamina (Sigma Chemical Co., USA) dissolvida em LCR artificial, nas concentrações de 2 µg/1 µL, adicionada de ácido ascórbico 0,2%.
- Hidroclorito de apomorfina (Sigma Chemical Co., USA) na dose de 0,5 mg/kg, dissolvido em de solução salina (NaCl 0,9%) adicionado de 0,1% de ácido ascórbico (s.c.).

- Haloperidol (i.p.) diluído em água destilada, na dose de 0,5 mg/kg.
- Tiopental sódico (i.p.) na dose de 200 mg/kg.

### 3.1.3 Lesão no feixe prosencefálico medial com 6-hidroxidopamina

Depois de anestesiados, realizou-se a tricotomia na cabeça dos animais, que foram então posicionados em aparelho estereotáxico (Insight). A desinfecção do local da cirurgia foi feita com álcool iodado, e com auxílio de bisturi fez-se a incisão de aproximadamente 2 cm para exposição da parte superior da calota craniana.

As coordenadas estereotáxicas foram então determinadas a partir do bregma: barra nasal: - 3,3 mm da barra interaural; antero-posterior: -1,9 mm do bregma; latero-lateral:  $\pm$  1,9 mm da linha mediana e dorso-ventral: - 7,2 mm do crânio (PAXINOS; WATSON, 1997), e em seguida foi feita perfuração no crânio com broca de baixa rotação, possibilitando a microinfusão da neurotoxina.

Os animais lesados receberam a infusão de solução com concentração 2  $\mu$ g de 6-OHDA em 1  $\mu$ L de LCR artificial, adicionado de 0,2% de ácido ascórbico. Esta solução foi aplicada bilateralmente no FPM, ou unilateralmente no FPM direito do animal. A solução de 6-OHDA foi infundida por intermédio de agulha 30 gauge, conectada a um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro), o qual estava adaptado a uma microseringa de 10  $\mu$ L (Hamilton, EUA). Esta foi encaixada em uma bomba de infusão (Insight BI 2000) programada para fluxo de 0,50  $\mu$ L/min, durante 4 minutos, injetando assim um total de 4 $\mu$ g de 6-OHDA em cada infusão.

Após o término da infusão, foram aguardados mais 4 minutos antes da agulha ser retirada lentamente, de forma a se evitar refluxo da droga. Os grupos falso operados, unilateralmente ou bilateralmente, foram submetidos à igual processo cirúrgico, com a introdução da agulha nas mesmas coordenadas, mas com infusão, de mesmo volume, de LCR artificial sem adição de 6-OHDA.

Depois da cirurgia, os animais foram deixados em sala com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) para recuperação da anestesia. Durante os cinco primeiros dias de recuperação pós-operatória, os animais permaneceram em caixas individuais, com dieta semi-líquida (feita com a própria ração). Nos dias subseqüentes, retornaram às caixas coletivas e receberam ração sólida.

### 3.2 OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Passado o período de recuperação pós-operatória de 5 dias, todos os animais foram submetidos a testes comportamentais realizados no período das 13:00 às 18:00 horas. Estabeleceu-se o intervalo de 24 horas entre cada teste como padrão para minimizar possíveis interferências entre eles.

Os animais foram avaliados nos testes de rotação, campo aberto (movimentação e exploração), tremor de mandíbula e catatonia.

#### 3.2.1 Teste rotacional

Neste teste, o animal lesado unilateralmente foi colocado em uma cuba redonda, com 40 cm de diâmetro e 25 cm de altura, na qual teve a liberdade total para se movimentar, no sentido horário e anti-horário. Cada animal recebeu 0,5 mg/kg de hidrocloreto de apomorfina s.c., dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) com 0,1% de ácido ascórbico, e imediatamente foi colocado na cuba de teste. Os animais foram observados durante 30 minutos e a contagem do número de rotações, tanto ipsilateral como contralateral à lesão, foi feita nos 15 minutos finais (TOUCHON *et al.*, 2004).

### 3.2.2 Teste do campo aberto

Este teste avalia a atividade motora do animal em ambiente com estímulo luminoso. Esta avaliação foi realizada nos animais lesados uni e bilateralmente.

O teste é realizado em uma arena circular com 100 cm de diâmetro, fechada com paredes laterais com 40 cm de altura, iluminada por quatro lâmpadas de 100 watts e cujo piso encontra-se marcado por um círculo central, circundado por dezoito quadrantes periféricos.

Os animais foram colocados na região central da arena e deixados explorar o ambiente durante 5 minutos. Foram quantificadas as deambulações efetuadas pelos animais durante este período através da contagem do número de quadrantes percorridos. Cada quadrante foi contabilizado toda vez que o animal o adentrava com as quatro patas. Neste teste, também foi avaliado o número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente, mantendo-se suspenso apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório do tipo *rearing*. Após cada animal ser testado, o campo aberto foi limpo com solução de etanol 10% (NALIWAIKO *et al.*, 2004).

### 3.2.3 Teste do tremor de mandíbula

A avaliação do tremor de mandíbula é descrita como modelo animal de tremor parkinsoniano (SALAMONE *et al.*; 1998; DÍAZ *et al.*; 2001) e evidencia-se em animal lesado bilateralmente.

Para esta avaliação, o animal foi colocado dentro de uma gaiola de metal (20 x 50 x 30 cm) repousada sobre uma superfície espelhada. Durante 15 minutos, foram contados os movimentos de tremor de mandíbula, cujas características são

movimentos de deflexão vertical rápida da mandíbula, que se assemelham à mastigação, porém não estão relacionados a nenhum tipo de estímulo.

#### 3.2.4 Teste da catatonia

Os animais lesados bilateralmente com 6-OHDA receberam injeção de solução de haloperidol (0,5 mg/kg) diluída em água destilada, para que se reproduzisse a rigidez muscular comumente encontrada na DP.

Neste teste, as patas dianteiras de cada animal foram colocadas sobre uma barra situada a 09 cm acima do plano em que devem ficar assentados os membros posteriores. Para isso, suas patas dianteiras foram colocadas na barra e depois, rápida e suavemente, as patas traseiras foram levadas ao piso, no qual a barra estava repousada, de tal maneira que o animal ficasse em posição quase vertical. O desempenho na catatonia, determinado pelo tempo de imobilidade do animal, foi avaliado 15 minutos após a aplicação da droga (adaptado de DEKUNDY *et al.*, 2006).

### 3.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO

A extração dos lipídeos das amostras de tecido encefálico (córtex e substância negra esquerda) foi realizada de acordo com o método descrito por Folch, Lees e Stanley (1957). Tais amostras tiveram seus conteúdos lipídicos determinados através do método de cromatografia líquida de alta precisão (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC).

A amostra de tecido foi homogeneizada em 400 µL de solução salina com tampão fosfato (PBS), pH 7,4, durante 2 minutos, e ao sobrenadante resultante foi adicionado 500 µL de metanol e 1000 µL de clorofórmio. Após agitação durante 15



segundos, foram centrifugadas por 2 minutos a 2.500 rpm a 4°C em centrífuga Eppendorf (modelo 5810R). Este procedimento promoveu a formação de uma solução bifásica, cuja fase superior (hidrometanólica) foi separada e colocada em novo tubo de ensaio.

Para o procedimento de reextração, adicionou-se à amostra 500 µL de clorofórmio e 500 µL de metanol. Novamente agitada e centrifugada por 2 minutos a 2.500 rpm a 4°C, coletou-se a fase inferior e a fase superior foi descartada.

Ao extrato clorofórmico resultante das duas extrações, foi adicionado 1000 µL do solvente de Folch (solução clorofórmio:metanol:água, na proporção de 3:47:48). A solução foi então centrifugada, a fase superior descartada, e a fase inferior resultante (orgânica) evaporada e submetida à secagem em fluxo de nitrogênio gasoso, em banho-maria a 37°C.

Após secagem, as amostras contendo os lipídeos foram submetidas ao processo de saponificação, no qual foram separados apenas os ácidos graxos dos lipídeos totais. Para este processo, em cada amostra foram acrescentados 100 µL de metanol e 2000 µL de solução alcalina em metanol contendo 1 mol/L de hidróxido de sódio em metanol a 90%. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C, sob agitação por 2 horas (NISHIYAMA-NARUKE *et al.*, 1998).

Passado o período de incubação, as amostras foram resfriadas em banho de gelo, durante 10 minutos, e a solução foi acidificada, até atingir pH 3.0, com ácido clorídrico 1 mol/L. Os ácidos graxos contidos nesta solução foram extraídos 3 vezes, com adição de 1000 µL de hexano e agitação durante 30 segundos cada vez. O solvente resultante destas extrações foi evaporado com fluxo de nitrogênio gasoso, em banho-maria de 37 °C.

A derivatização dos ácidos graxos com bromometil-metoxi-coumarina (BMMC) foi realizada segundo o método descrito por Abushufa, Reed e Weinkove (1994). Foram preparados os seguintes reagentes: 10 mg BMMC dissolvido em 1g/mL de acetonitrila (reagente nº 1); 26,5 mg de *18-crown-6-ether* e 100 mg de carbonato de potássio, dissolvidos em 5 mL de acetonitrila (reagente nº 2). A

solução do reagente nº 2 foi sonicada durante 30 minutos e logo após outros 5 mL de acetonitrila foram adicionados. O sobrenadante, que foi separado do precipitado, foi estocado em temperatura de 4°C.

As amostras foram reconstituídas em 100 µL de acetonitrila e agitadas durante 30 segundos. Após este processo, foram adicionados às amostras 100 µL do reagente nº 1, 100 µL do reagente nº 2 e 100 µL de acetonitrila. As amostras foram novamente agitadas e mantidas a 60 °C por 15 minutos em placa aquecedora. Posteriormente as mesmas foram filtradas em filtro 0,22 µm (Millex, USA) e transferidas para outros frascos, nos quais foram mantidas a 10°C até o momento da análise através de HPLC.

Para a análise dos ácidos graxos derivatizados através de detector de fluorescência, foram realizadas injeções de 50 µL dos derivados diluídos, sob fluxo de 1,2 mL/min a temperatura ambiente. Os compostos foram detectados fluorimetricamente, com excitação a 325 nm e emissão a 398 nm. Na fase móvel, foi realizado um gradiente binário com acetonitrila e água. O gradiente linear consistiu-se de 77 a 90% de acetonitrila até 50 minutos, os quais foram constantemente degaseificados com gás hélio.

Para a técnica analítica de HPLC foi utilizado o equipamento Varian ProStar 230, com auto injetor ProStar 410 e detector de fluorescência Flu 363 com interface de integração Star 800. A coluna analítica utilizada para a separação dos ácidos graxos derivatizados foi de fase reversa: Licosorv – C8 4,6 mm i.d. x 25 cm com partículas de 5 µm (Varian) precedida de pré-coluna (G-ODS 8,0 mm i.d.x x 1,5 cm). O software utilizado para integração e registro dos dados foi o Star, versão 4.0.

### 3.4 AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA

Os animais foram sacrificados por decapitação, e seus estriados dissecados rapidamente sobre placa de gelo, pesados e congelados em freezer à -80 °C, até o momento de terem os níveis de DA, DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético) e HVA (ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético) avaliados através do método de cromatografia líquida de alta precisão com detecção eletroquímica (HPLC-ED).

Estas estruturas foram homogeneizadas em 800 µL de solução contendo 0,2 M de ácido perclórico, 0,1 mM de EDTA (Merck) e 0,45 µM de 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA) como padrão interno. Foram então centrifugadas por 20 minutos a 12,000 g, e o sobrenadante foi filtrado com filtro 0,22 µm (Millex, Millipore). Deste filtrado, 10 µL de cada amostra foi injetada em auto-injetor (SIL-10 Advp; Shimadzu, Kyoto, Japan). A separação foi realizada por coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) (Shim-pack VP-ODS, 5µm; Shimadzu), precedida de uma coluna de proteção C18 (10 x 4,6 mm) (Shim-pack GVP-ODS, 5 µm; Shimadzu). A fase móvel foi preparada com água Milli-Q, 100 mM de fosfato de sódio dihidrogenado, 10 mM de cloreto de sódio, 0,1 mM de EDTA, 0,40 mM de ácido sódio-1-octanosulfônico (Sigma) e 20% metanol. O pH foi ajustado em 3,5 com ácido fosfórico. O fluxo estimado foi de 0,9 mL/min, bombeado por um pistão duplo (LC-10 Advp; Shimadzu). O detector potencial foi 0,65V vs. *in situ* Ag/AgCl (Decade, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden, Netherlands). Os dados da cromatografia foram plotados usando software Class-VP (Shimadzu). DA, DOPAC e HVA foram identificados baseados no tempo de pico de retenção. A quantificação foi realizada por um método de padrão interno (DHBA como padrão interno) baseado na área abaixo do pico.

### 3.5 ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A concentração de proteínas da substância negra foi determinada utilizando-se, como padrão, uma solução de albumina 1mg/mL. Foram preparados os seguintes reagentes: (A) carbonato de sódio a 2%; hidróxido de sódio a 0,4%; tartrato sódico-potássico a 16% e SDS a 1% dissolvidos em água destilada; (B) sulfato de cobre penta-hidratado a 4% diluído em água destilada; (C) resultado da mistura dos reativos A e B nas proporções em volume 100:1 respectivamente; (D) reativo de Folin-Ciocalteu, que consiste em reativo comercial diluído 50% em água destilada. Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 µL) em 780 µL de água destilada e 2,0 mL do reativo C. Após a adição do reativo C, foram aguardados 10 minutos e acrescentados 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu. Passados 30 minutos, a concentração das proteínas de cada amostra foi determinada utilizando-se espectrofotômetro com absorvância a 625 nm (LOWRY *et al.*, 1951).

Os produtos resultantes da peroxidação lipídica nestas estruturas foram mensurados empregando-se as metodologias para detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), cuja técnica foi modificada de Buege e Aust (1978).

Foram colocados em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%; 0,25 mL de água destilada; 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25 mL do homogeneizado. A seguir, agitou-se cada tubo, os quais foram aquecidos à temperatura de 100° C durante 15 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados e acrescentou-se 1,5 mL de álcool n-butílico, para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm. Por último, o produto corado foi retirado, sendo feita então sua leitura em espectrofotômetro (CARY 3E - UV - Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBARs foi expressa em nmoles/mg de proteína.

### 3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os animais foram anestesiados (200 mg/kg tiopental sódico) e perfundidos transcardiacamente com solução salina, seguida de solução de paraformaldeído a 4% em 0,1 M de tampão fosfato, pH 7,4. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos, pós-fixados na mesma solução fixadora a temperatura ambiente durante 2 horas e então foram crioprotégidos por imersão em solução de sacarose 30% diluída em solução tampão fosfato e acondicionados a 4 °C. Secções coronais (50 µm) foram obtidas por um criostato (Leitz, Digital 1702) e coletadas em PBS. Para a imunohistoquímica, as secções foram pré-tratadas com metanol 10% diluído em peróxido de hidrogênio a 3% durante 30 minutos. Cuidadosamente lavadas e bloqueadas com 3% de soro caprino normal (NGS) em PBS contendo 0,3% de Triton X-100 (PBS-Tx Sigma) durante 30 minutos, as secções foram incubadas com anticorpo monoclonal de camundongos (Sigma) diluído 1:750 contendo 3% de NGS em PBS-Tx por 48 horas a 4 °C. Depois de lavados várias vezes com PBS-Tx, os tecidos foram incubados com anticorpo secundário biotilado (Dako Corporation, Carpinteria, CA) diluído 1:200 em PBS-Tx a temperatura ambiente por 2 horas. As secções foram novamente lavadas em PBS e incubadas com estreptavidina conjugada a peroxidase (Dako) diluída 1:100 em PBS durante 90 minutos à temperatura ambiente.

A reação de imunohistoquímica foi desenvolvida através da incubação das secções em meio contendo 0,06% de 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma) dissolvida em PBS por 10 minutos, e em seguida com a mesma solução contendo 1 µM de peróxido de hidrogênio a 3% por mL de DAB no meio por 10 minutos. Imediatamente, as secções foram enxaguadas com PBS, desidratadas com etanol, limpas com xileno e cobertas com Permout e lamínula. Secções controles foram preparadas omitindo-se o anticorpo primário e o substituindo por PBS. Cortes coronais foram selecionados de acordo com Paxinos e Watson (1997) e as leituras

foram realizadas entre a coordenada interaural 4,2 mm, bregma -4,8 mm e interaural -2,7 mm, bregma -6,3 mm. Na SNpc e na área tegmentar ventral a densidade óptica foi avaliada semi-quantitativamente por densitometria.

#### 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  Erro Padrão da Média e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguidos do pós-teste de Duncan.

Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes para  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MASSA CORPORAL

Os animais dos grupos experimentais foram pesados em dias alternados, para avaliação de possível alteração em massa corporal (FIGURA 9). A massa no dia de desmame foi considerada 100%, e sua curva de representação não mostrou diferença significativa entre o grupo que recebeu a suplementação diária com óleo de peixe e o grupo que recebeu somente a ração controle (ANOVA  $F(1,98) = 0,10$ ;  $p = 0,75$ ).

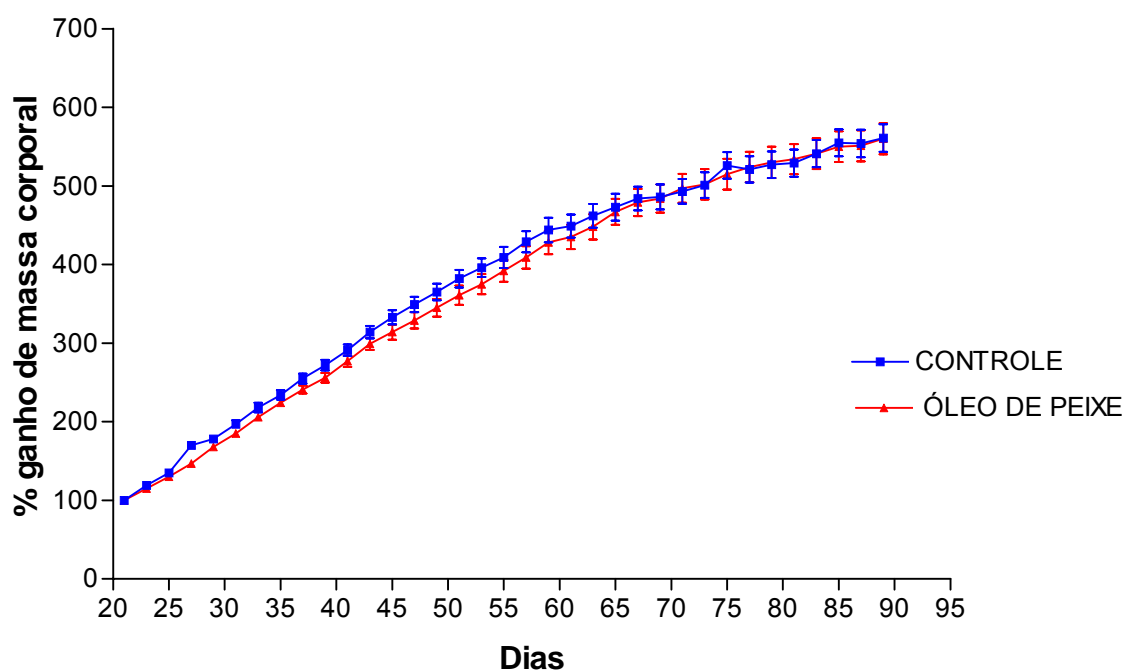


FIGURA 9 - CONTROLE DA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE E SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. PÓS-TESTE DE DUNCAN, PRECEDIDO DE ANOVA DE UMA VIA. OP  $n=10$ ; C  $n=10$



## 5.2 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

### 5.2.1 Teste rotacional

Os resultados deste teste mostraram que houve um aumento significativo no número de rotações, induzidas por apomorfina, do lado contralateral à lesão nos animais lesados com 6-OHDA em comparação aos animais não lesados ou falso operados (ANOVA  $F(1,79) = 1084,30$ ;  $p=0,0001$ ). Observou-se também que os animais lesados e suplementados com óleo de peixe apresentaram menor número deste comportamento, quando comparados aos animais lesados controles (ANOVA  $F(1,79) = 10,43$ ;  $p \leq 0,05$ ).

A rotação ipsilateral esteve presente em todos os grupos experimentais, no entanto, com valores que não expressaram alterações significativas, tanto no grupo lesado, falso operado e não lesado (ANOVA  $F(1,79) = 3,67$ ;  $p = 0,07$ ), como nos animais suplementados ou controles (ANOVA  $F(1,79) = 0,007$ ;  $p = 0,93$ ) (FIGURA 10).

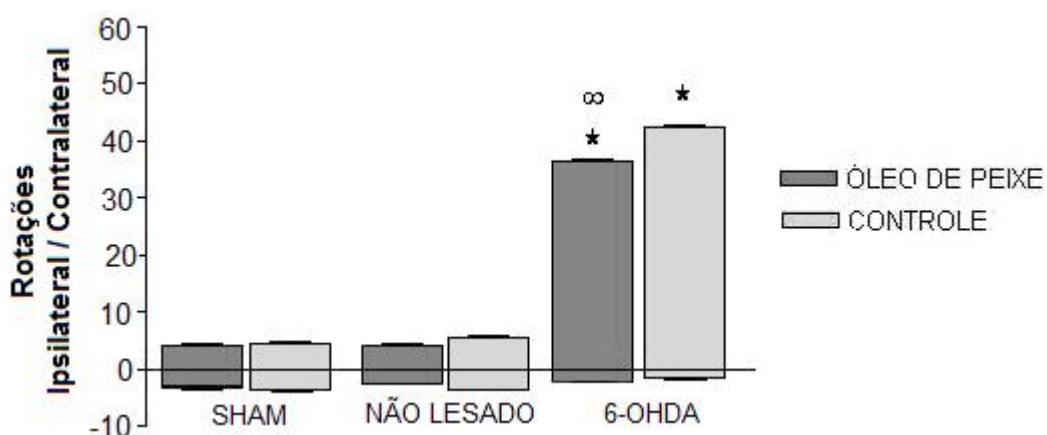


FIGURA 10 - ATIVIDADE ROTACIONAL IPSILATERAL E CONTRALATERAL DOS ANIMAIS LESADOS UNILATERALMENTE COM 6-OHDA, GRUPO SHAM E NÃO LESADO, SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE OU CONTROLES. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. \*DIFERENÇA NA ROTAÇÃO CONTRALATERAL ENTRE OS GRUPOS LESADOS COM 6-OHDA, SHAM E NÃO LESADOS ( $p=0,0001$ ). ∞DIFERENÇA NA ROTAÇÃO CONTRALATERAL ENTRE O GRUPO LESADO QUE RECEBEU ÓLEO DE PEIXE E O GRUPO LESADO CONTROLE ( $p \leq 0,05$ ). OP/6-OHDA  $n=14$ , C/6-OHDA  $n=13$ , OP/SHAM  $n=14$ , C/SHAM  $n=14$ , OP/NL  $n=13$ , C/NL  $n=15$ . Valores negativos expressam rotações ipsilaterais e os valores positivos rotações contralaterais

### 5.2.2 Teste do campo aberto

A aplicação da dose de 4  $\mu\text{g}$  de 6-OHDA unilateralmente foi suficiente para causar uma redução no número de quadrantes deambulados pelos animais lesados com 6-OHDA em comparação aos animais falso operados e não lesados (ANOVA  $F(1,71) = 18,02$ ;  $p = 0,0001$ ). No entanto, o óleo de peixe não se mostrou eficaz em alterar quantitativamente este comportamento (ANOVA  $F(1,71) = 0,52$ ;  $p = 0,47$ ) (FIGURA 11).

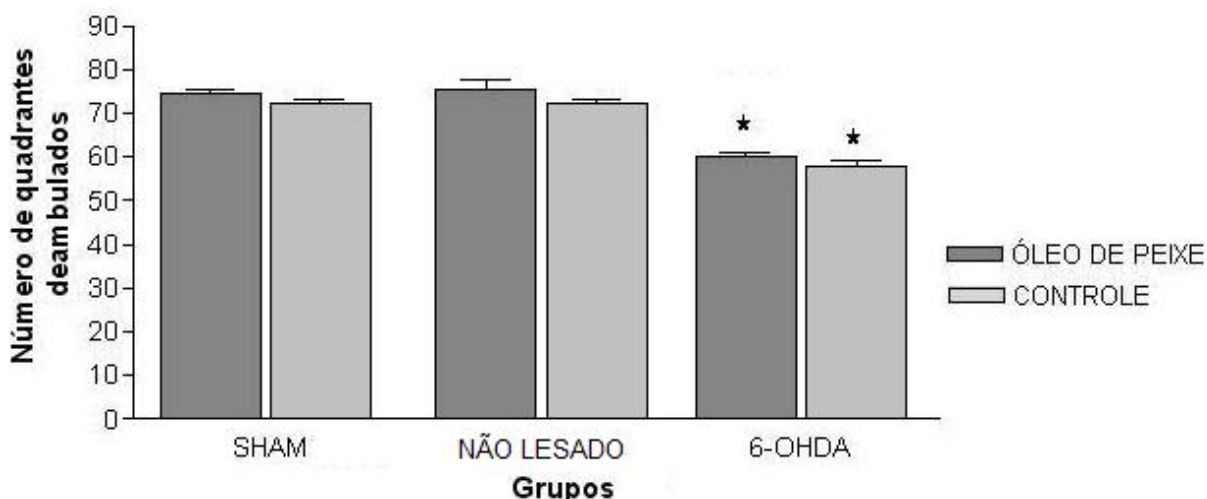


FIGURA 11 - ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS LESADOS UNILATERALMENTE COM 6-OHDA, SHAM E NÃO LESADOS, SUPLEMENTADOS OU CONTROLES. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. \*DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS LESADOS COM 6-OHDA E NÃO LESADOS ( $p=0,0001$ ). OP/6-OHDA  $n=13$ , C/6-OHDA  $n=13$ , OP/SHAM  $n=14$ , C/SHAM  $n=12$ , OP/NL  $n=11$ , C/NL  $n=12$

Ainda no teste do campo aberto, estes animais não apresentaram alterações significativas no comportamento exploratório (FIGURA 12) entre os grupos experimentais, tanto para o tratamento com 6-OHDA (ANOVA de duas vias  $F(1,71) = 2,80$ ;  $p = 0,09$ ), como para a suplementação com óleo de peixe (ANOVA de duas vias  $F(1,71) = 1,27$ ;  $p = 0,26$ ).

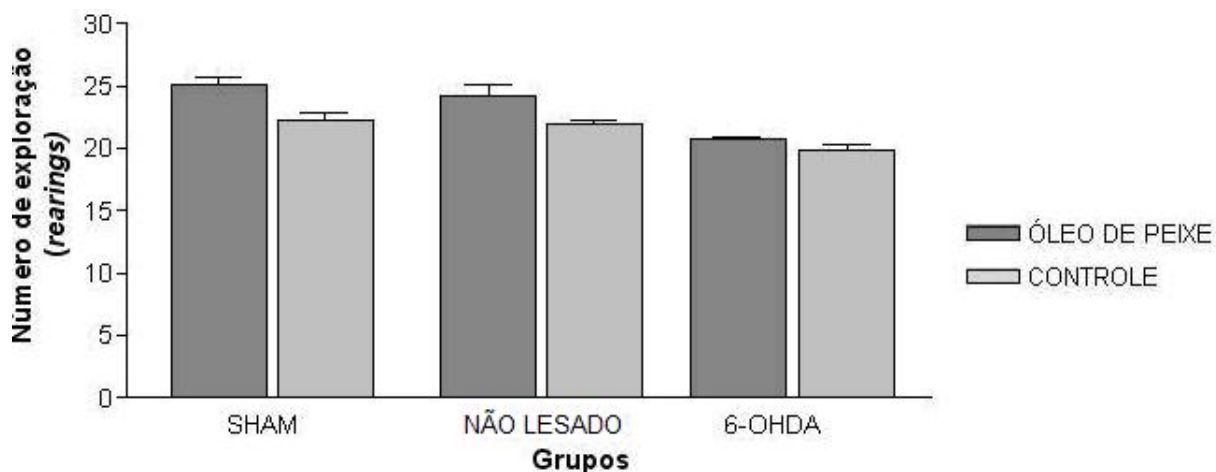


FIGURA 12 - ATIVIDADE EXPLORATÓRIA (*REARINGS*) DOS ANIMAIS LESADOS UNILATERALMENTE COM 6-OHDA, SHAM E NÃO LESADOS, SUPLEMENTADOS OU CONTROLES. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. PÓS-TESTE DE DUNCAN PRECEDIDO DE ANOVA DE DUAS VIAS. OP/6-OHDA  $n=13$ , C/6-OHDA  $n=13$ , OP/SHAM  $n=14$ , C/SHAM  $n=12$ , OP/NL  $n=11$ , C/NL  $n=12$

Os animais lesados bilateralmente com 6-OHDA, quando analisados no teste de campo aberto, demonstraram significativa diminuição no número de quadrantes deambulados em comparação aos animais falso operados e não lesados (ANOVA  $F(1,42) = 62,16$ ;  $p = 0,0001$ ) (FIGURA 13). Este comportamento, entretanto, não apresentou alteração significativa nos grupos de animais suplementados com óleo de peixe ou controles (ANOVA de duas vias  $F(1,42) = 0,71$ ;  $p = 0,40$ ).

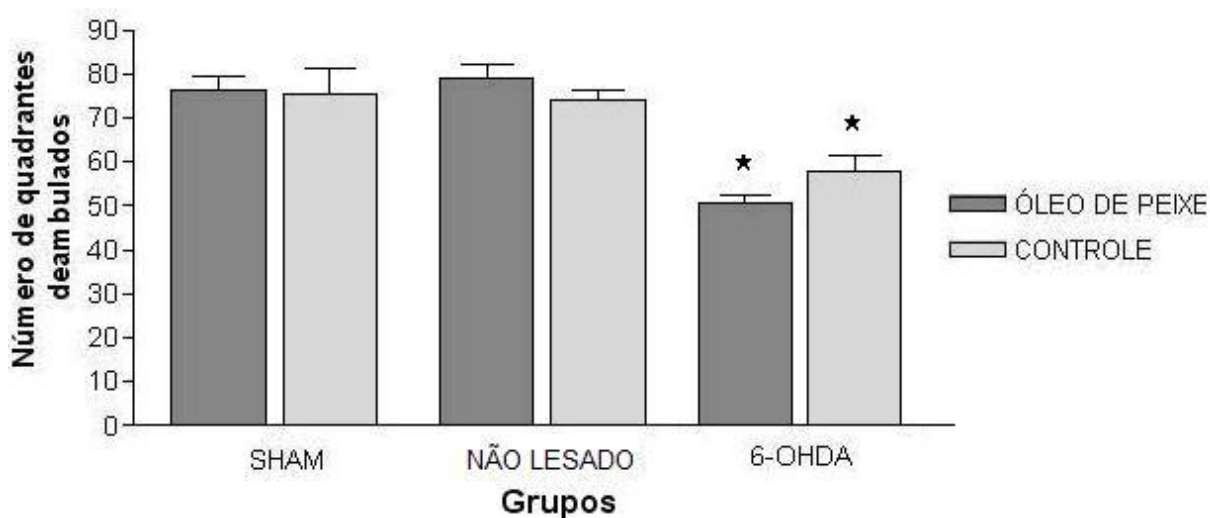


FIGURA 13 - ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS LESADOS BILATERALMENTE COM 6-OHDA, SHAM E NÃO LESADOS, SUPLEMENTADOS OU CONTROLES. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA DE PÓS-TESTE DE DUNCAN. \*DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS LESADOS, SHAM E NÃO LESADOS ( $p = 0,0001$ ). OP/6-OHDA  $n=9$ , C/6-OHDA  $n=8$ , OP/SHAM  $n=8$ , C/SHAM  $n=7$ , OP/NL  $n=7$ , C/NL  $n=7$

Resultado semelhante ao da ambulação foi observado no comportamento exploratório (FIGURA 14), no qual os animais lesados bilateralmente com 6-OHDA tiveram redução no número de explorações em relação aos animais falso operados e não lesados (ANOVA  $F(1,42) = 21,09$ ;  $p = 0,0001$ ). Da mesma forma, não houve diferença neste comportamento entre os animais suplementados e controles (ANOVA de duas vias  $F(1,42) = 0,14$ ;  $p = 0,71$ ).

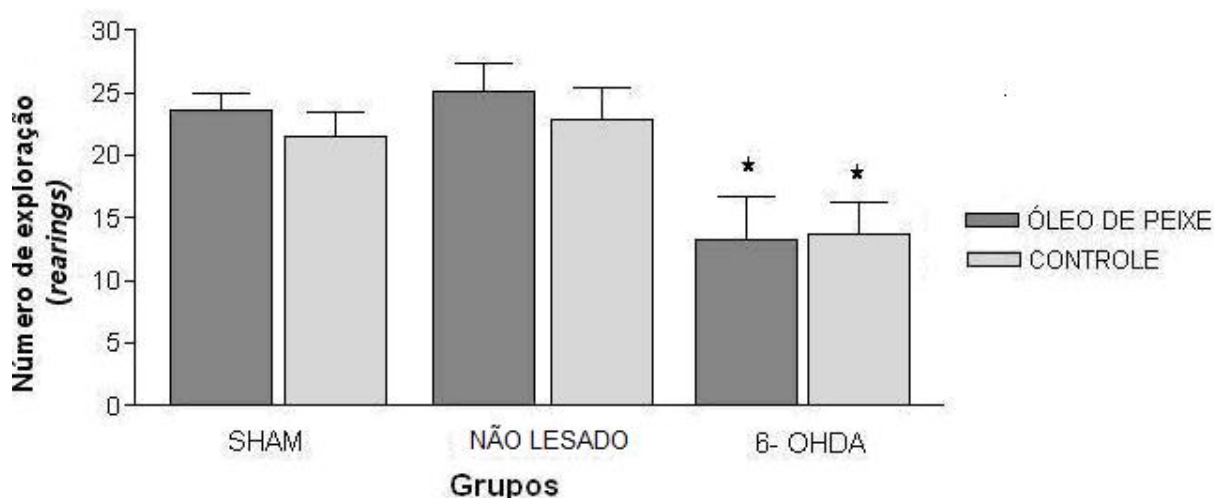


FIGURA 14 - ATIVIDADE EXPLORATÓRIA (REARINGS) DOS ANIMAIS LESADOS BILATERALMENTE COM 6-OHDA, SHAM E NÃO LESADOS, SUPLEMENTADOS OU CONTROLES. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. PÓS-TESTE DE DUNCAN PRECEDIDO DE ANOVA DE DUAS VIAS \*DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS LESADOS, SHAM E NÃO LESADO ( $p = 0,0001$ ). OP/6-OHDA  $n=9$ , C/6-OHDA  $n=8$ , OP/SHAM  $n=8$ , C/SHAM  $n=7$ , OP/NL  $n=7$ , C/NL  $n=7$

### 5.2.3 Teste do tremor de mandíbula

A Figura 15 demonstra o número de tremores de mandíbula apresentados pelos animais durante um período de 15 minutos. Fica evidente o aumento deste comportamento nos animais lesados bilateralmente com 6-OHDA em relação aos animais falso operados ou não lesados (ANOVA  $F(1,40) = 174,85$ ;  $p = 0,0001$ ). Contudo, os animais suplementados diariamente com óleo de peixe não tiveram desempenho diferente dos animais que receberam ração controle (ANOVA de duas vias  $F(1,40) = 0,07$ ;  $p = 0,79$ ).

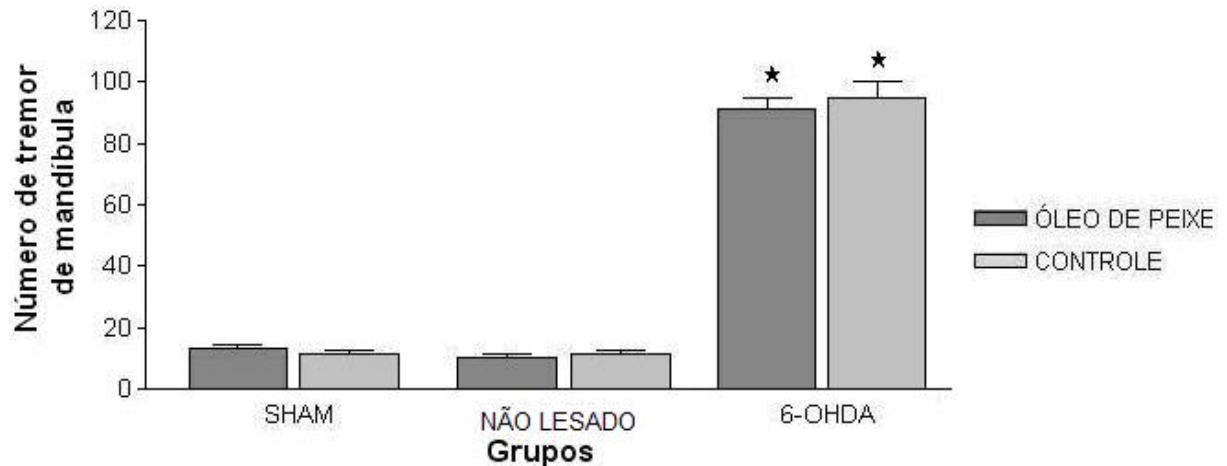


FIGURA 15 – EFEITO DA INFUSÃO BILATERAL DE 6-OHDA SOBRE O TREMOR DE MANDÍBULA. CADA ANIMAL FOI AVALIADO DURANTE 15 MINUTOS. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA ± EPM. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA DE PÓS-TESTE DE DUNCAN. \*DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS LESADOS, SHAM E NÃO LESADOS ( $p = 0,0001$ ). OP/6-OHDA  $n=8$ , C/6-OHDA  $n=7$ , OP/SHAM  $n=8$ , C/SHAM  $n=7$ , OP/NL  $n = 7$ , C/NL  $n=7$

#### 5.2.4 Teste da catatonia

Os resultados para o teste da catatonia nos animais lesados bilateralmente com a neurotoxina 6-OHDA, expostos na Figura 16, mostram que não houve diferença no tempo de imobilidade entre os grupos lesados, falso operados ou não lesados (ANOVA  $F(1,41) = 0,62$ ;  $p = 0,43$ ). Estes dados também demonstram que a inclusão diária da suplementação com óleo de peixe não alterou estes valores (ANOVA de duas vias  $F(1,41) = 1,34$ ;  $p = 0,25$ ).

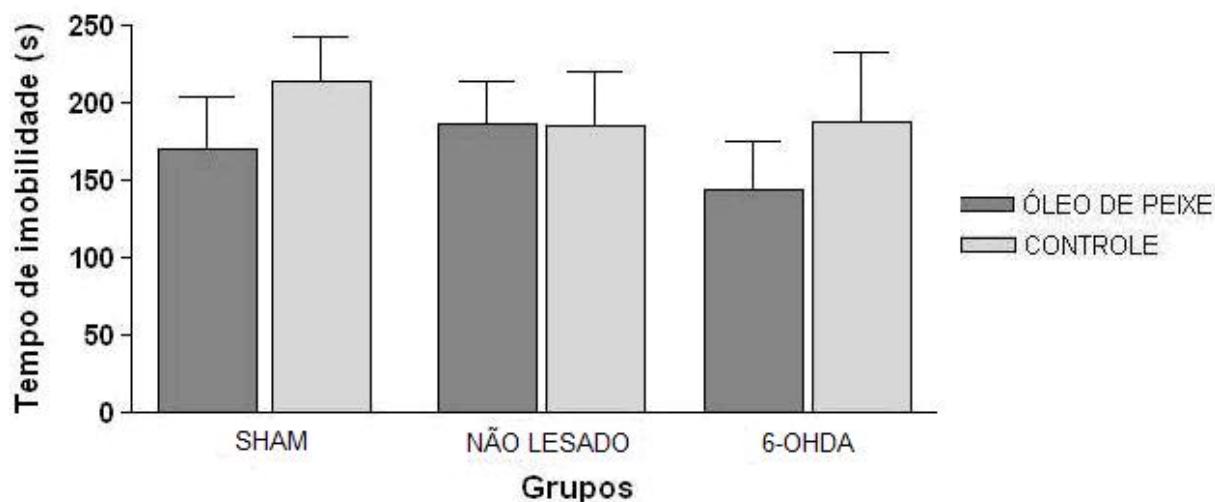


FIGURA 16 – EFEITO DA INFUSÃO BILATERAL DE 6-OHDA NO TESTE DE CATATONIA. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA DE PÓS-TESTE DE DUNCAN. OP/6-OHDA  $n=8$ , C/6-OHDA  $n=7$ , OP/SHAM  $n=8$ , C/SHAM  $n=7$ , OP/NL  $n=7$ , C/NL  $n=7$

### 5.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO

A análise do perfil lipídico do córtex encefálico (TABELA 1) indica que os animais que receberam a suplementação com óleo de peixe tiveram redução significativa na porcentagem encontrada de ácido graxo linoléico, pertencente à família n-6, (ANOVA  $F(3,6) = 111,73$ ;  $p=0,0001$ ) e aumento do conteúdo de DHA, pertencente à família n-3 (ANOVA  $F(3,6) = 41,98$ ;  $p = 0,001$ ) nas membranas analisadas.

TABELA 1 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DE CÓRTEX ENCEFÁLICO

Ácidos Graxos	CÓRTEX	CEREBRAL		
	OP/6-OHDA (n=3)	C/6-OHDA (n=2)	OP/NL (n=2)	C/NL (n=3)
Palmitico (16:0)	38,01 ± 1,66	45,15 ± 4,05	38,32 ± 1,02	43,64 ± 0,68
Palmitoléico (16:1 n-7)	0,67 ± 0,01	0,52 ± 0,10	0,60 ± 0,03	0,59 ± 0,05
Estearico (18:0)	1,94 ± 0,19	1,86 ± 0,76	1,90 ± 0,36	1,17 ± 0,13
Oléico (18:1 n-9)	21,70 ± 0,78	9,48 ± 9,48	21,31 ± 0,07	18,81 ± 0,90
Linoléico (18:2 n-6)	0,86 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,56 ± 0,18	0,89 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,27 ± 0,15
α-linolênico (18:2 n-3)	0	0	0	0
Aracdônico (20:4 n-6)	13,33 ± 0,36	15,19 ± 0,26	13,43 ± 1,27	14,49 ± 0,17
EPA (20:5 n-3)	0	0	0	0
DHA (22:6 n-3)	23,82 ± 0,81 <sup>b</sup>	18,65 ± 2,45	24,45 ± 0,16 <sup>b</sup>	18,16 ± 1,02

OS VALORES REPRESENTAM AS MÉDIAS ± EPM. ANOVA DE UMA VIA SEGUIDA DO PÓS-TESTE DE DUNCAN. <sup>a</sup> p=0,0001 QUANDO COMPARADO ANIMAIS SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE E CONTROLES; <sup>b</sup> p=0,001 QUANDO COMPARADO ANIMAIS SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE E CONTROLES

O percentual de DHA encontrado na análise da substância negra dos animais que receberam suplementação com óleo de peixe mostrou-se significativamente elevado quando comparado aos animais que receberam somente ração controle (ANOVA F(3,6) = 30,56; p = 0,001). Os percentuais dos demais ácidos graxos encontrados nas membranas desta estrutura estão representados na Tabela 2.

TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DE SUBSTÂNCIA NEGRA ESQUERDA

Ácidos Graxos	SUBSTÂNCIA NEGRA			
	OP/6-OHDA (n=3)	C/6-OHDA (n=2)	OP/NL (n=2)	C/NL (n=3)
Palmitico (16:0)	28,86 ± 1,68	33,86 ± 0,11	34,83 ± 0,38	36,22 ± 14,01
Palmitoléico (16:1 n-7)	0,58 ± 0,001	0,56 ± 0,02	0,58 ± 0,01	0,61 ± 0,04
Estearico (18:0)	5,09 ± 0,42	4,98 ± 0,14	4,71 ± 0,40	5,74 ± 0,55
Oléico (18:1 n-9)	31,58 ± 1,31	30,29 ± 0,27	29,34 ± 0,78	17,38 ± 17,38
Linoléico (18:2 n-6)	0,55 ± 0,27	0,67 ± 0,04	0,74 ± 0,01	0,93 ± 0,03
α-linolênico (18:2 n-3)	0	0	0	0
Aracdônico (20:4 n-6)	11,35 ± 0,20	10,54 ± 0,53	9,60 ± 0,62	12,55 ± 2,28
EPA (20:5 n-3)	0	0	0	0
DHA (22:6 n-3)	21,97 ± 0,25 <sup>a</sup>	16,21 ± 0,23	20,19 ± 0,27 <sup>a</sup>	14,74 ± 0,27

OS VALORES REPRESENTAM AS MÉDIAS ± EPM. ANOVA DE UMA VIA SEGUIDA DE PÓS-TESTE DE DUNCAN; <sup>a</sup> p=0,001 QUANDO COMPARADO ANIMAIS SUPLEMENTADOS E CONTROLES

#### 5.4 AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA

A avaliação neuroquímica do estriado esquerdo (lado não lesado) não revelou diferença estatística nas concentrações de DA (ANOVA de uma via  $F(5,43) = 1,04$ ;  $p = 0,41$ ), DOPAC (ANOVA de uma via  $F(5,43) = 0,41$ ;  $p = 0,84$ ) e HVA (ANOVA de uma via  $F(5,43) = 0,98$ ;  $p = 0,40$ ) entre todos os grupos experimentais (TABELA 3).

Este dado valida o uso dos valores encontrados no lado contralateral à lesão como controle nos animais lesados unilateralmente. Por isso, as concentrações de DA, DOPAC e HVA no lado lesado foram expressas em porcentagem, tomando-se como base as concentrações do lado não lesado.



TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE DOPAMINA E SEUS METABÓLITOS NO ESTRIADO NÃO LESADO

GRUPO	ESTRIADO ESQUERDO (ng/mg tecido)		
	DA (n=8)	DOPAC (n=8)	HVA (n=8)
OP/6-OHDA	5,83 ± 0,37	4,00 ± 0,54	0,96 ± 0,04
C/6-OHDA	5,16 ± 0,41	3,28 ± 0,63	1,07 ± 0,12
OP/SHAM	6,46 ± 0,22	3,34 ± 0,41	1,06 ± 0,05
C/SHAM	5,99 ± 0,77	4,00 ± 0,81	1,12 ± 0,05
OP/NÃO LESADO	6,09 ± 0,60	4,20 ± 0,40	0,98 ± 0,06
C/NÃO LESADO	6,90 ± 0,83	3,62 ± 0,67	1,17 ± 0,11

OS VALORES REPRESENTAM AS MÉDIAS ± EPM. ANOVA DE UMA VIA SEGUIDA DE PÓS-TESTE DE DUNCAN

Os animais que receberam injeção da neurotoxina 6-OHDA apresentaram redução na porcentagem de DA (ANOVA  $F(1,43) = 106,63$ ;  $p = 0,0001$ ) (FIGURA 17) e de seus metabólitos, DOPAC (ANOVA  $F(1,43) = 70,31$ ;  $p = 0,0001$ ) (FIGURA 18) e HVA (ANOVA  $F(1,43) = 54,96$ ;  $p = 0,0001$ ) (FIGURA 19) no estriado ipsilateral (lado direito) quando comparado ao estriado contralateral à lesão (lado esquerdo). Entretanto, a suplementação com óleo de peixe não foi eficaz em modificar estes resultados, que permaneceram iguais estatisticamente aos animais que não foram suplementados (controles); DA (ANOVA de duas vias  $F(1,43) = 2,00$ ;  $p = 0,16$ ), DOPAC (ANOVA de duas vias  $F(1,43) = 0,23$ ;  $p = 0,64$ ) e HVA (ANOVA de duas vias  $F(1,43) = 1,34$ ;  $p = 0,25$ ).

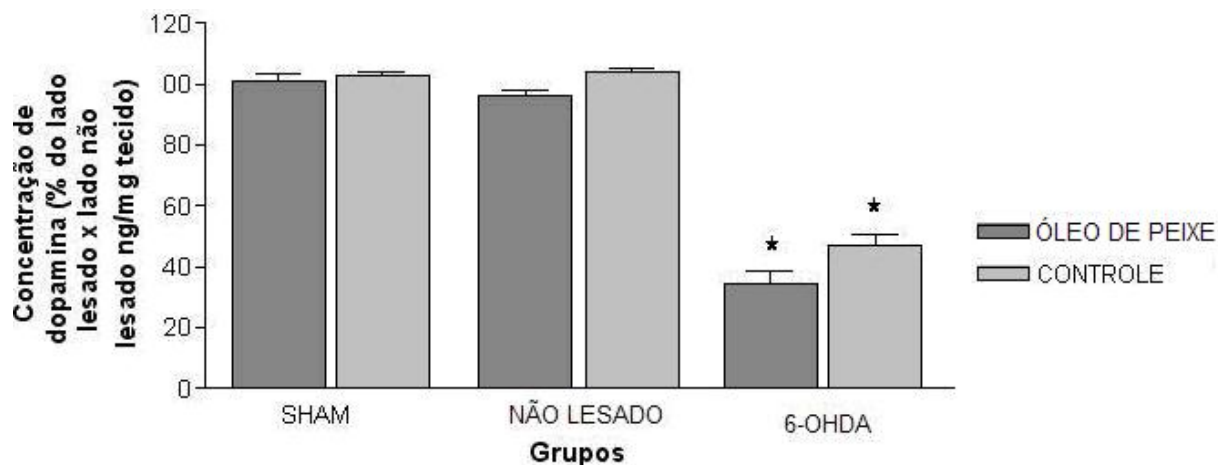


FIGURA 17 – CONCENTRAÇÃO ESTRIATAL DE DOPAMINA NOS GRUPOS 6-OHDA, FALSO OPERADOS E NÃO LESADOS NOS ANIMAIS SUPLEMENTADOS OU CONTROLES. OS VALORES SÃO DESCRITOS COMO PORCENTAGEM DO LADO LESADO *VERSUS* NÃO LESADO. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA DE PÓS-TESTE DE DUNCAN. \*DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS LESADOS, SHAM E NÃO LESADOS ( $p=0,0001$ ). OP/6-OHDA  $n=8$ , C/6-OHDA  $n=8$ , OP/SHAM  $n=8$ , C/SHAM  $n=8$ , OP/NL  $n=8$ , C/NL  $n=8$

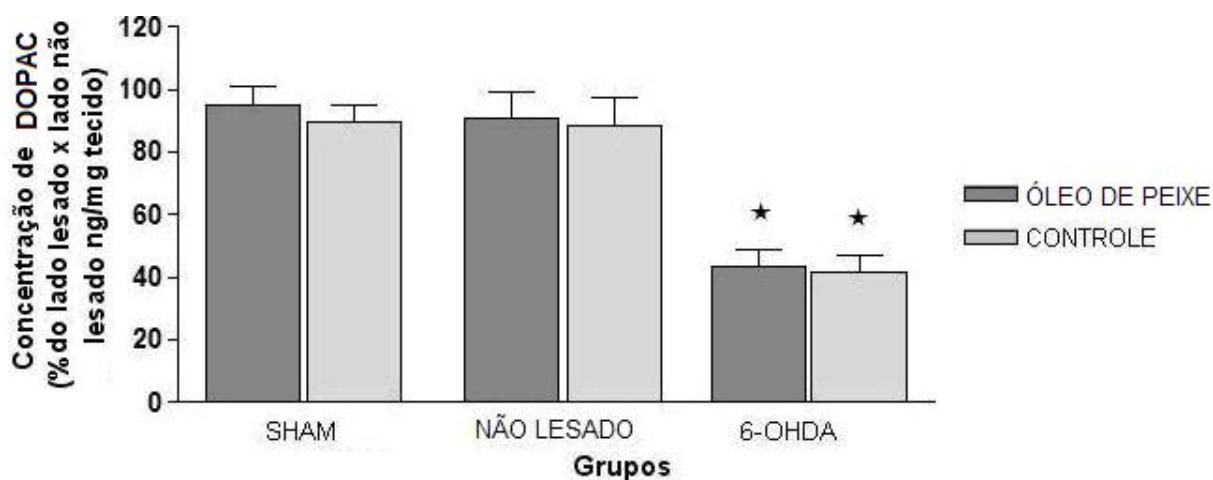


FIGURA 18 – CONCENTRAÇÃO ESTRIATAL DE DOPAC NOS GRUPOS 6-OHDA, FALSO OPERADOS E NÃO LESADOS NOS ANIMAIS SUPLEMENTADOS OU CONTROLES. OS VALORES SÃO DESCRITOS COMO PORCENTAGEM DO LADO LESADO *VERSUS* NÃO LESADO. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA DE PÓS-TESTE DE DUNCAN. \*DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS LESADOS, SHAM E NÃO LESADOS ( $p=0,0001$ ). OP/6-OHDA  $n=8$ , C/6-OHDA  $n=8$ , OP/SHAM  $n=8$ , C/SHAM  $n=8$ , OP/NL  $n=8$ , C/NL  $n=8$

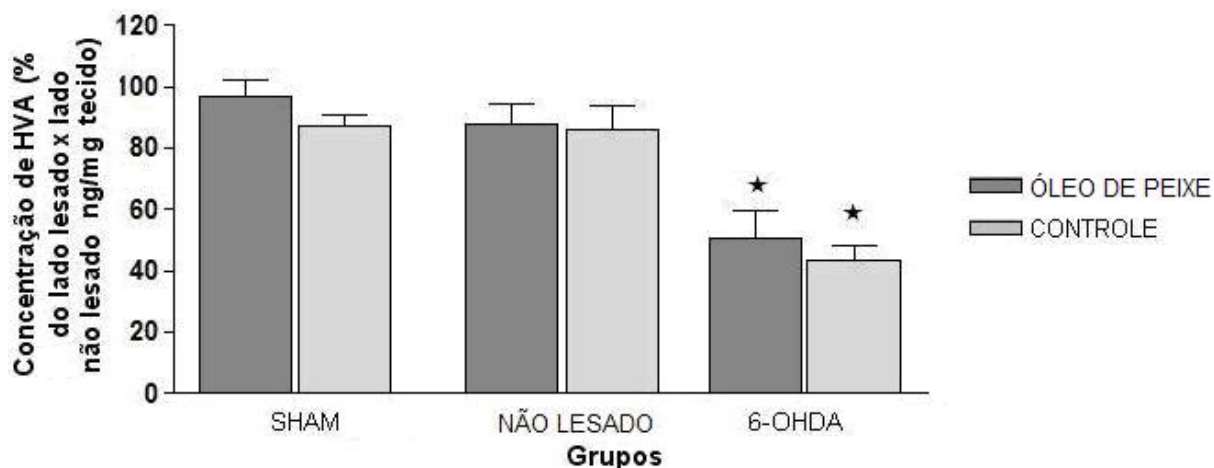


FIGURA 19 – EFEITO DA INFUSÃO UNILATERAL DE 6-OHDA SOBRE A CONCENTRAÇÃO ESTRIATAL DE HVA NOS GRUPOS ÓLEO DE PEIXE E CONTROLE. OS VALORES SÃO DESCRITOS COMO PORCENTAGEM DO LADO LESADO *VERSUS* NÃO LESADO. RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. ANOVA DE DUAS VIAS E PÓS-TESTE DE DUNCAN. \* DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS LESADOS E NÃO LESADOS ( $p = 0,0001$ ) OP/6-OHDA  $n=8$ , C/6-OHDA  $n=8$ , OP/SHAM  $n=8$ , C/SHAM  $n=8$ , OP/CONTROLE  $n = 8$ , C/CONTROLE  $n=8$

## 5.5 PRODUTOS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA SUBSTÂNCIA NEGRA

A taxa de peroxidação lipídica, determinada pelo método de TBARs na substância negra do hemisfério esquerdo dos animais (contralateral à lesão com 6-OHDA), manteve-se sem alterações significativas em todos os grupos experimentais (ANOVA  $F(5,22) = 0,84$ ;  $p = 0,53$ ) (TABELA 4). Portanto, as taxas de peroxidação no lado lesado foram expressas em porcentagem, tomando-se como base as concentrações do lado não lesado.

TABELA 4 – TAXA DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA SUBSTÂNCIA NEGRA CONTRALATERAL À LESÃO

<b>SUBSTÂNCIA NEGRA ESQUERDA (nMol/mg proteína)</b>	
GRUPO	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA
OP/6-OHDA (n=5)	0,60 ± 0,04
C/6-OHDA (n=5)	0,64 ± 0,03
OP/SHAM (n=4)	0,74 ± 0,08
C/SHAM (n=5)	0,70 ± 0,09
OP/NÃO LESADO (n=5)	0,72 ± 0,06
C/NÃO LESADO (n=5)	0,75 ± 0,04

OS VALORES REPRESENTAM AS MÉDIAS ± EPM. PÓS-TESTE DE DUNCAN PRECEDIDO DE ANOVA DE UMA VIA

Os resultados expostos na Figura 20 demonstram que os animais alimentados somente com ração controle e lesados com 6-OHDA tiveram taxa de peroxidação significativamente aumentada quando comparados aos animais dos demais grupos (ANOVA  $F(1,24) = 23,37$ ;  $p = 0,0001$ ), inclusive aos animais lesados e suplementados com óleo de peixe. Desta forma, sugere-se que a suplementação rica em ácidos graxos da família n-3 foi eficaz em reduzir a peroxidação lipídica.

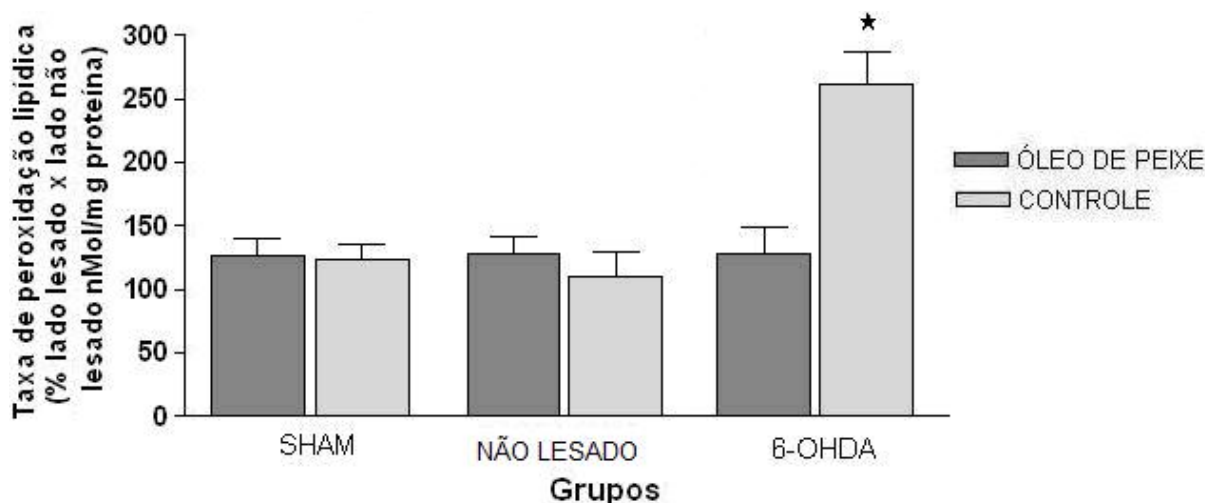


FIGURA 20 –TAXA DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA SUBSTÂNCIA NEGRA NOS ANIMAIS DOS GRUPOS 6-OHDA, FALSO OPERADOS E NÃO LESADOS, SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE E CONTROLE. OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. ANOVA DE DUAS VIAS E PÓS-TESTE DE DUNCAN. \*DIFERENÇA ENTRE O GRUPO LESADO CONTROLE E DEMAIS GRUPOS ( $p=0,0001$ ). OP/6-OHDA  $n=5$ , C/6-OHDA  $n=5$ , OP/SHAM  $n=4$ , C/SHAM  $n=5$ , OP/NL  $n=5$ , C/NL  $n=5$

## 5.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

A análise estatística dos resultados que avaliaram a densidade óptica mostrou que a mesma foi significativamente reduzida pela infusão de 6-OHDA no lado direito (lesado) tanto na SNpc (ANOVA  $F(1,24) = 11,13$ ;  $p < 0,05$ ) (FIGURA 21) como em VTA (ANOVA  $F(1,24) = 19,62$ ;  $p = 0,001$ ) (FIGURA 22). Além disso, a suplementação com óleo de peixe não teve atuação protetora sobre os neurônios dopaminérgicos, pois os animais que a receberam mantiveram a redução na densidade óptica tanto na SNpc (ANOVA  $F(1,24) = 0,09$ ;  $p = 0,77$ ) como em VTA (ANOVA  $F(1,24) = 0,06$ ;  $p = 0,81$ ).

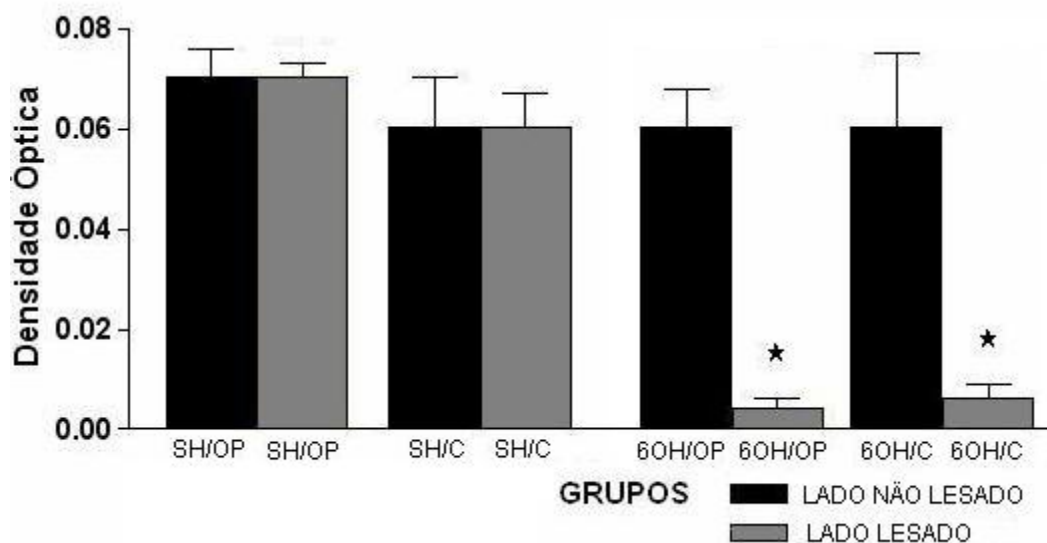


FIGURA 21 – EFEITO DA INFUSÃO UNILATERAL DE 6-OHDA SOBRE A DENSIDADE ÓPTICA NA SUBSTÂNCIA NEGRA NOS ANIMAIS DOS GRUPOS 6-OHDA (6OH) E FALSO OPERADOS (SH), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU CONTROLES (C). OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. ANOVA DE DUAS VIAS E PÓS-TESTE DE DUNCAN. \* DIFERENÇA ENTRE O GRUPO LESADO CONTROLE E DEMAIS GRUPOS ( $p < 0,05$ ). C/SHAM  $n=3$ , OP/SHAM  $n=3$ , C/6-OHDA  $n=4$ , OP/6-OHDA  $n=4$

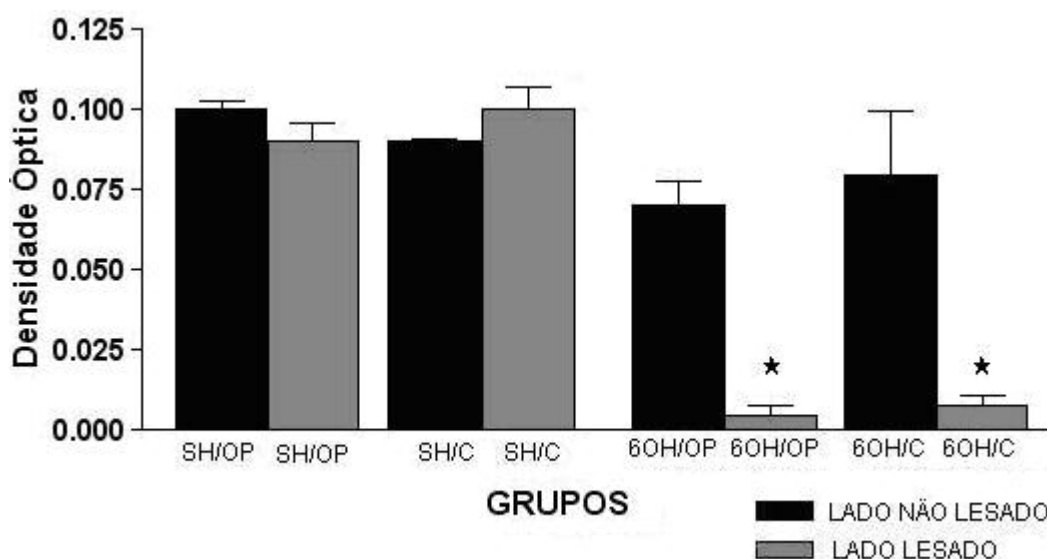


FIGURA 22 – EFEITO DA INFUSÃO UNILATERAL DE 6-OHDA SOBRE A DENSIDADE ÓPTICA NA ÁREA TEGMENTAR VENTRAL NOS ANIMAIS DOS GRUPOS 6-OHDA (6OH) E FALSO OPERADOS (SH), SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU CONTROLES (C). OS RESULTADOS EXPRESSAM A MÉDIA  $\pm$  EPM. ANOVA DE DUAS VIAS E PÓS-TESTE DE DUNCAN. \*DIFERENÇA ENTRE O GRUPO LESADO CONTROLE E DEMAIS GRUPOS ( $p=0,001$ ). C/SHAM  $n=3$ , OP/SHAM  $n=3$ , C/6-OHDA  $n=4$ , OP/6-OHDA  $n=4$ .

A Figura 23 mostra imagens digitalizadas da densidade óptica na SNpc e na VTA de animais do grupo suplementado com óleo de peixe ou controles, que receberam 6-OHDA ou foram falsamente operados.

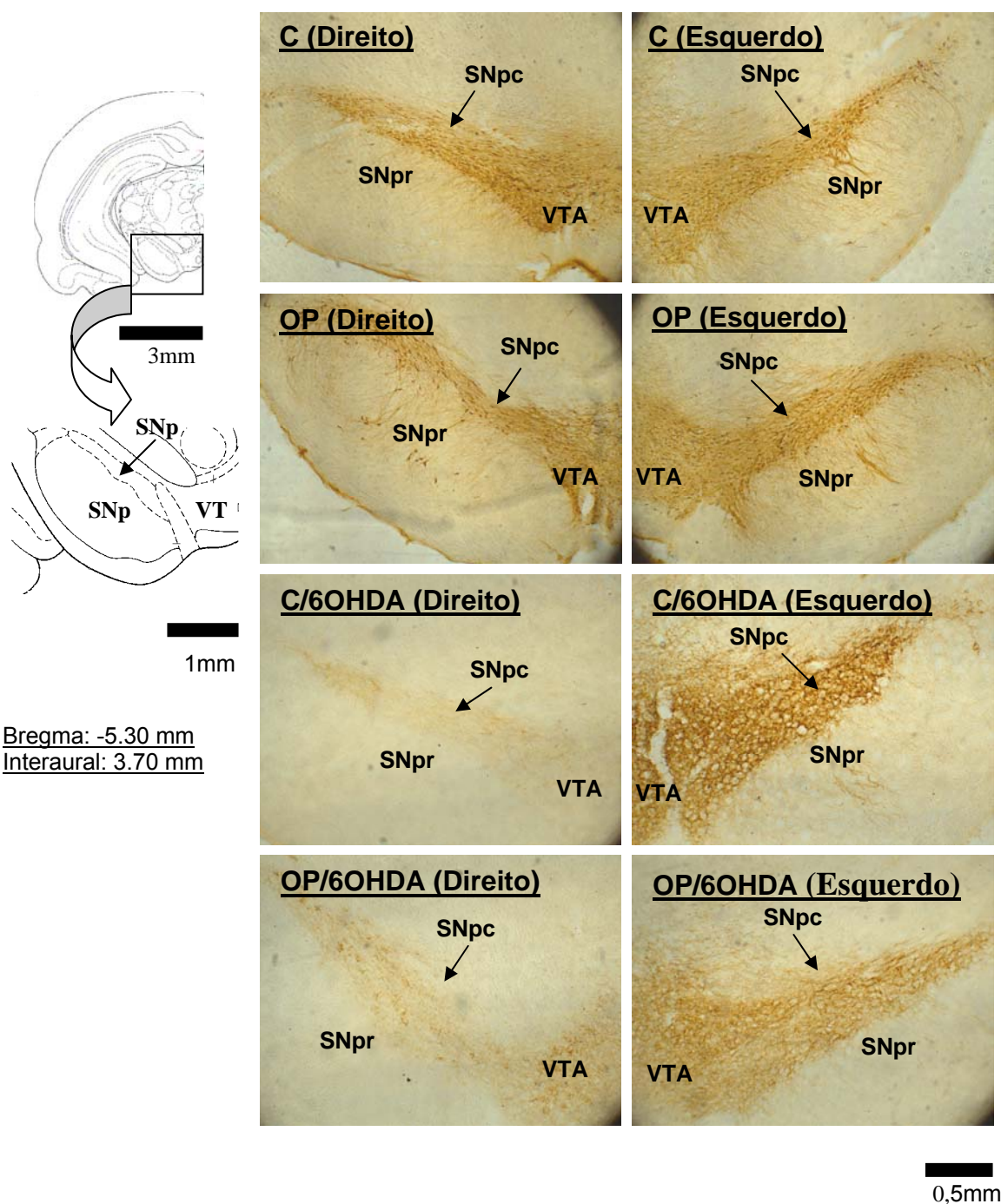


FIGURA 23 - IMAGEM DIGITALIZADA DA DENSIDADE ÓPTICA NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA E NA ÁREA TEGMENTAR VENTRAL. SNpr: substância negra parte reticular; SNpc: substância negra parte compacta; VTA: área tegmentar ventral; OP: óleo de peixe; C: controle; 6-OH:DA: 6-hidroxidopamina

## 6 DISCUSSÃO

A presença de ácidos graxos poliinsaturados influencia diretamente a composição fosfolipídica das membranas celulares e determina suas propriedades biofísicas básicas (SHAPIRO, 2003) como estabilidade, fluidez e permeabilidade. Além disso, podem estar diretamente envolvidos em complexas cascatas de sinalização em compartimento nuclear ou citosólico (SANGIOVANNI; CHEW, 2005), assim como em funções de proteínas de membranas, receptores e canais iônicos (FAROOQUI; HORROCKS; FAROOQUI, 2000).

A importância da incorporação dos AGPIs, nas membranas neuronais é amplamente divulgada, pois pode atuar benéficamente na atividade encefálica (HORROCKS; FAROOQUI, 2004; MAZZA *et al.*, 2007) e em diferentes neuropatologias, tais como doença de Alzheimer, depressão e esquizofrenia (McNAMARA; CARLSON, 2006; CALON; COLE, 2007; CHIU *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2008).

A doença de Parkinson ocupa o segundo lugar na categoria das doenças neurodegenerativas mais comuns (HOWELLS *et al.*, 2005), e possui prevalência de 1 a 3 % (PRZEDBORSKI, 2005) na população mundial com idade superior a 55 anos (EMBORG, 2004). Esta neuropatologia é caracterizada pela degeneração das células dopaminérgicas mesencefálicas e progressivo decréscimo do conteúdo de dopamina no corpo estriado (AGUIAR *et al.*, 2006), o que leva ao aparecimento de sinais cardinais como tremor de repouso, rigidez, bradicinesia, disfunção na marcha e instabilidade postural (OBESO; OLANOW; NUTT, 2000).

De Lau *et al.* (2005) sugerem, através de estudo epidemiológico com análise de questionário de hábitos alimentares, que o consumo de AGPIs da família n-3 está intimamente relacionado com um baixo risco de desenvolvimento da DP. Recentemente, Bousquet *et al.* (2008) evidenciaram os efeitos dos AGPIs em camundongos expostos ao MPTP. Tais autores relatam atuação benéfica destes



ácidos graxos na manutenção do transportador de dopamina (DAT) e sobre contagem de neurônios dopaminérgicos. Entretanto, poucos estudos contemplam a associação entre dieta enriquecida com AGPIs e a sintomatologia comumente encontrada na DP. Por isso, analisamos através de modelo animal o efeito da suplementação crônica com AGPIs da família n-3 sobre aspectos motores e bioquímicos desta doença.

Em se tratando de suplementação com AGPIs, existem diversos protocolos descritos na literatura em modelos animais, tanto para a maneira de fornecimento de AGPIs, que pode ser através de dieta enriquecida (FARKAS *et al.*, 2002; CLARKE *et al.*, 2005 ou através de via oral (NALIWAICO *et al.*, 2004; FERRAZ *et al.*, 2008b), como nas doses, que podem variar entre 0,2 g/kg/dia (SAMADI *et al.*, 2006) a 10 g/kg/dia (YONEKUBO *et al.*, 1993). Neste trabalho, a suplementação via oral com 4,0 g/kg/dia de composto enriquecido com EPA e DHA foi realizada a partir do 21º ao 90º dia de vida do animal. Em trabalhos prévios desenvolvidos no laboratório de Neurofisiologia da UFPR, os autores evidenciaram que a suplementação com DHA e EPA em ratas durante a gestação e a lactação, período crítico para maturação cortical, sinaptogênese e mielinização, poderia prevenir psicopatologias em seus filhotes quando adultos. Quando o período de suplementação foi do 21º ao 90º dia de vida, esta também se mostrou como uma janela efetiva em prevenir o desenvolvimento de comportamento depressivo no teste de natação forçada (FERRAZ *et al.*, 2008b). A partir deste conhecimento, e do fato da segunda fase de suplementação ter duração mais exígua, optamos em escolher esta janela temporal na realização deste trabalho.

Pelo fato dos AGPIs serem gorduras, a suplementação durante 69 dias poderia promover um aumento de massa corporal. Estudos realizados em ratos que foram cronicamente suplementados com DHA, nas doses de 1,25 g/kg/dia (ARTERBURN *et al.*, 2000), 2,5 g/kg/dia (WAINWRIGHT *et al.*, 1998) ou 3,0 g/kg/dia (NALIWAICO *et al.*, 2004), evidenciaram não haver modificações na massa corporal entre o grupo suplementado e controle. Resultado similar foi encontrado nesta

pesquisa, na dose de 4,0 g/kg/dia, já que os valores de massa corpórea dos animais que receberam somente ração controle não se demonstraram estatisticamente diferente dos valores dos animais que, além da ração controle, receberam suplementação com DHA e EPA (FIGURA 9). Este dado nos sugere que, apesar do óleo de peixe representar uma fonte de calorias, seu uso crônico, nesta dose, não leva à deposição de triacilglicerol no tecido adiposo em quantidades suficientes para aumentar a massa corporal.

Um dos objetivos deste trabalho foi reproduzir aspectos motores similares aos encontrados na DP. Para tanto, efetuamos lesão com 6-OHDA no FPM, uni ou bilateralmente, dependendo da necessidade da redução dos neurônios dopaminérgicos ser simétrica ou não, para o aparecimento do sintoma a ser testado nos testes comportamentais. Os testes de tremor de mandíbula e catatonía foram realizados em animais lesados bilateralmente; já o teste de rotação, nos animais lesados unilateralmente. A avaliação do comportamento locomotor e exploratório no teste do campo aberto foi realizada tanto nos animais lesados uni e bilateralmente.

A literatura evidencia que o aparecimento e a intensidade dos déficits motores, em modelos animais, são 6-OHDA dose dependente (DÍAZ *et al.*, 2001). Truong *et al.* (2006), realizou infusão de 6-OHDA no FPM nas doses de 4, 8 e 16 µg, demonstrando que 4 µg se provou ser a menor dose capaz de causar o aparecimento do comportamento rotacional, justificando a escolha desta dose neste trabalho.

O modelo de rotação está relacionado com alterações motoras, como as discinesias decorrentes da levodopaterapia prolongada classicamente utilizada no tratamento da DP (LANE; CHEETHAM; JENNER, 2006), e é amplamente utilizado para avaliar a integridade do sistema nigroestriatal e a supersensitividade pós-sináptica dopaminérgica (EMBORG, 2004; YUAN *et al.*, 2005). Em nosso modelo experimental, os resultados mostraram que os animais lesados mantiveram comportamento rotacional predominantemente contralateral à lesão e em valores significativamente diferentes dos animais do grupo falso operado ou controle, de maneira condizente com a redução dopaminérgica estriatal (FIGURA 10).

Samadi *et al.* (2006) descrevem os benefícios da suplementação com DHA nas discinesias induzidas por levodopa em macacos expostos ao MPTP. Estes autores mostraram que a administração deste AGPI antes ou depois da terapia com levodopa foi hábil em reduzir a severidade ou atrasar o desenvolvimento deste distúrbio em primatas não humanos. Nossos dados corroboram com o exposto por estes autores, já que os animais lesados com 6-OHDA que receberam a suplementação com DHA e EPA mostraram expressiva redução no número de rotações, quando comparados aos animais lesados que receberam somente ração controle.

O substrato preciso para o entendimento de como a redução de DA em domínios motores pode afetar sua habilidade no desenvolvimento de discinesia ainda permanece obscuro (SAMADI *et al.*, 2006), assim como os mecanismos de ação dos AGPIs da família n-3 sobre este evento. Alguns fatores, entretanto, podem estar envolvidos na etiologia da discinesia. Para Calon *et al.* (2000) e Cardoso (2003), a reposição dopaminérgica intermitente promove uma concentração supra-limiar de dopamina nas sinapses, contrastando com a atividade nigroestriatal fisiológica. Assim, a internalização do receptor dopaminérgico ou alterações em sua responsividade, como resultado do tratamento com levodopa, podem causar danos nestes receptores e alterações em segundos mensageiros (GRAYBIEL *et al.*, 2000). Obeso, Olanow e Nutt (2000) discutem possíveis alterações na circuitaria dos núcleos da base no desenvolvimento de discinesias induzidas. Estes pesquisadores propõem que, na discinesia, exista uma redução de atividade neuronal no núcleo subtalâmico, o que proporcionaria redução dos efeitos inibitórios do globo pálido interno sobre os neurônios tálamo-corticais, levando ao aparecimento dos movimentos hiperkinéticos.

Embora o mecanismo de ação dos AGPIs sobre a discinesias permaneça desconhecido, Julien *et al.* (2006) mostraram, através de análise do perfil lipídico pós-morte em macacos com DP e portadores de discinesias induzidas por levodopaterapia, que estes apresentavam redução nos níveis de DHA e aumento de

gordura saturada no córtex. Ainda, Samadi *et al.* (2006) propõem que os benefícios da suplementação com DHA nas discinesias decorram da interação deste ácido graxo com receptores retinóides. Somados a este estudo, os resultados da nossa pesquisa sugerem um efeito neuroprotetor do óleo de peixe nas discinesias. Contudo, outros estudos devem ser realizados para que possamos explicar os possíveis mecanismos envolvidos no aparecimento e/ou desenvolvimento das discinesias, sobre os quais o óleo de peixe, rico em ácidos graxos da família n-3, possa estar refletindo alterações moleculares, histológicas e funcionais.

Com relação aos demais sintomas parkinsonianos, os estudos que investigam dados comportamentais na DP apresentam resultados bastante controversos. Sakai e Gash (1994) citam que, mesmo com a inerente assimetria dopaminérgica em modelos hemiparkinsonianos, os animais não demonstram bradicinesia, e, segundo Lane, Cheetham e Jenner (2006), continuam apresentando habilidade relativamente normal na capacidade de controle e direção na locomoção.

Diaz *et al.* (2001) afirmam que, para ocorrer comprometimento motor, é necessária degeneração bilateral do sistema dopaminérgico. Porém, nossos resultados mostraram que os animais lesados tanto unilateralmente como bilateralmente apresentaram comportamento locomotor reduzido em comparação aos animais controles (FIGURA 11,12,13 e 14), corroborando os dados de Truong *et al.* (2006). Estes autores compararam a velocidade de deambulação em animais com lesão unilateral com 16 µg, 8 µg e 4µg de 6-OHDA, a partir do momento da lesão até a 10ª semana. A redução na velocidade foi proporcional à extensão da lesão; todavia, mesmo na menor dose (4µg), a diferença entre o grupo lesado e grupo sham esteve presente até a décima semana após infusão de 6-OHDA.

A administração de 6-OHDA (4µg) de forma bilateral em nosso estudo não induziu síndrome de afagia e adipsia, nem mesmo aumento de mortalidade nos animais, as quais são descritas por outros autores como consequência da degeneração decorrente de lesão bilateral dos neurônios dopaminérgicos (GASH; SAKAI, 1994; TRUONG *et al.*, 2006).

Trabalho recente desenvolvido em nosso laboratório (DA SILVA *et al.*, 2008) com pacientes parkinsonianos que receberam suplementação alimentar com cápsulas de óleo de peixe mostrou não haver alteração no desempenho motor destes pacientes, avaliado pela escala de Hoehn & Yahr<sup>1</sup>, antes ou depois da suplementação de 3 meses.

Neste trabalho presente, os animais que foram suplementados com óleo de peixe, rico em n-3, também não apresentaram alteração no comportamento da ambulação, reduzido pela injeção de neurotoxina 6-OHDA, tanto uni quanto bilateralmente. Resultado semelhante, obtidos em macacos com parkinsonismo induzido por MPTP, foi sustentado por Samadi *et al.* (2006). Os autores concluíram que a suplementação com DHA não influenciou a atividade locomotora ou os índices de escore parkinsoniano, que mensuravam a grau de disfunção motora nos macacos estudados. Outros autores que estudaram a associação entre AGPIs n-3 e locomoção em animais sem síndrome parkinsoniana também não encontraram efeito destes AGPIs sobre a ambulação (NALIWAIKO *et al.*, 2004; FERRAZ *et al.*, 2008b).

Da mesma forma, quando avaliamos o teste de tremor de mandíbula, conceituado como modelo de tremor parkinsoniano (SALAMONE *et al.*, 1998), estes ácidos graxos também falharam em reduzir os tremores gerados pela 6-OHDA (FIGURA 15). Isto nos sugere que estas disfunções motoras, mesmo estando relacionadas com diferentes sub-regiões do complexo estriatal (DÍAZ *et al.*, 2001), não são susceptíveis às alterações geradas pelas propriedades do DHA e EPA.

Em humanos, o tônus muscular, a rigidez ou a espasticidade são avaliados diretamente a partir de medições biomecânicas reativas, ou indiretamente a partir de medições eletrofisiológicas da atividade muscular, porém, existem várias dificuldades com a aplicação análoga em modelos animais de DP (WU; HYLAND; CHEN, 2007). Contudo, a catatonía, um sinal motor caracterizado pela persistência de posturas anormais, é considerado um modelo de rigidez muscular similar ao

---

<sup>1</sup> Escala de avaliação do comprometimento motor que se baseia na classificação dos pacientes em 5 estágios de doença, sendo que o valor zero significa não ter sintoma presente, valor 1 nos sintomas unilaterais discretos, até o valor 5 que é o grau máximo de incapacitação.

encontrado na DP (DÍAZ *et al.*, 2001). Estudo recente publicado por Lopez *et al.* (2008) mostra que animais que receberam dose equivalente a 12,5 µg de 6-OHDA no FPM e que foram testados no teste de catatonía com indução por haloperidol na dose de 1 mg/kg apresentaram um profundo estado de rigidez quando comparado aos animais controle. Resultado semelhante, também com a aplicação de haloperidol na dose de 0,5 mg/kg, foi encontrado por Mo *et al.* (2008) em modelo de DP induzido pela aplicação de 20 µg de 6-OHDA no FPM.

Em nosso experimento, aplicamos 0,5 mg/kg de haloperidol (i.p.) em cada animal, dose amplamente divulgada na literatura (DEKUNDY *et al.*, 2006; MO *et al.*, 2008). Nesta dose, o haloperidol causou o aumento do tempo de imobilidade em todos os grupos experimentais, mas a lesão causada pela injeção de 4 µg de 6-OHDA no FPM, não se mostrou suficiente para tornar o tempo de latência dos animais lesados diferente dos animais falsamente operados e controles (FIGURA 16). Com isso, sugerimos que o aparecimento deste sintoma seria 6-OHDA dose dependente, bem como diretamente proporcional à extensão da degeneração do sistema nigroestriatal.

A suplementação com composto enriquecido com DHA e EPA durante 69 dias, isto é, a partir do 21º ao 90º dia de vida do animal, causou aumento da incorporação do DHA nas membranas tanto do córtex cerebral como da substância negra, o que não foi observado nos animais do grupo que receberam somente ração controle. No entanto, nas amostras analisadas não foram encontradas concentrações de EPA (TABELA 1 e 2). Resultados de trabalhos recentes confirmam a restrita concentração de EPA na composição lipídica cortical. Bousquet *et al.* (2008) analisaram amostras de córtex de ratos que receberam ração enriquecida com AGPIs da família n-3 e viram que este tratamento não alterou significativamente a concentração de EPA em relação aos animais controles. Além disso, os autores mostram que, mesmo fornecendo este ácido graxo, sua concentração encontra-se em índice 46 vezes menor que a concentração de DHA no tecido analisado. Em concordância, Julien *et al.* (2006) evidenciaram que em tecido

cerebral humano, em média apenas 0,08% do total de ácidos graxos é encontrado como EPA, em contraste com a presença de 13,90% de DHA.

Segundo Horrocks e Faroqui (2004), devido à ampla função desempenhada pelo DHA no tecido neuronal, seu conteúdo é constantemente repostado diretamente a partir da dieta através de precursores e transportados ao tecido cerebral. Entretanto, o endotélio cerebral também é capaz de sintetizar o DHA via enzima  $\Delta$ -6 dessaturase por mecanismo de retroconversão, nos quais os astrócitos são hábeis em sintetizar DHA a partir de cadeias com 18 ( $\alpha$ -linolênico), 20 (ácido eicosatetraenóico e EPA), 22 (ácido docosapentaenóico) e 24 carbonos (ácido tetracosahexaenóico), por meio de alongamento e dessaturação destas cadeias. Assim, para os resultados de incorporação lipídica nos tecidos cerebrais realizados em nosso experimento, nos quais observamos alto índice de DHA e ausência de EPA, levantamos a hipótese de que o EPA possa ter sido utilizado como precursor na cascata de conversão que culmina com a formação de DHA.

Youdim *et al.* (2000) relatam que, no processo de envelhecimento e neurodegenerativo, há extenso comprometimento da função sináptica ocasionado por alterações morfológicas e funcionais correlacionadas com o declínio dos AGPIs. Em trabalho que estudou a incorporação lipídica nas membranas dos eritrócitos de pacientes idosos (de 61 a 99 anos), foi comprovada a diminuição desta incorporação às membranas e conseqüente diminuição da fluidez nas mesmas (RABINI *et al.*, 2002). Em contrapartida, Julien *et al.* (2006), em estudo comparativo entre o perfil lipídico pós-morte de pacientes controles e portadores de DP com e sem discinesias, mostraram não haver diferenças entre os três grupos analisados quanto aos índices de DHA e EPA. Estes autores sugerem que a DP *per se* não está associada com alterações no perfil dos ácidos graxos dos fosfolípidios corticais. Porém, tal estudo trata-se de um trabalho isolado analisando o perfil lipídico em humanos com uma amostra pequena em cada grupo, cujos resultados não podem ser generalizados para o conjunto da população parkinsoniana.

Uma vez que, no trabalho presente, houve aumento de incorporação de AGPIs nas membranas neuronais, nos preocupamos em saber se esta incorporação não estava acompanhada de alteração na taxa de peroxidação lipídica, pois um aumento no conteúdo de duplas ligações poderia ser altamente vulnerável à oxidação. Para avaliarmos esta hipótese, utilizamos o método de TBARs, que nos mostrou que a introdução da suplementação diária na dose de 4 g/kg não aumentou a taxa de peroxidação lipídica no grupo falso operado, mantendo-se igual ao grupo falso operado não suplementado (TABELA 4). Nossos resultados estão em concordância com os obtidos por Ando *et al.* (2000) e Naliwaiko *et al.* (2004), os quais mostraram que animais que receberam ração enriquecida com 4,3 g/kg e 3,0 g/kg, respectivamente, de óleo de peixe não tiveram aumento na taxa de peroxidação lipídica no cérebro. No entanto, nos animais não suplementados que sofreram uma lesão provocada pela administração de 6-OHDA, os níveis de peroxidação lipídica apresentaram valores duas vezes maiores do que aqueles demonstrados pelos animais falsamente operados. Além disso, nos animais lesados com 6-OHDA e suplementados com óleo de peixe, o DHA foi decisivo na manutenção da taxa de peroxidação lipídica, a qual permaneceu igual àquelas apresentadas nos grupos falso operados (FIGURA 20).

Estudos pós-morte em cérebro de pacientes portadores de DP revelam que os neurônios dopaminérgicos podem ser deficientes em suportar o estresse oxidativo, e isto pode ser refletido tanto pelo aumento dos radicais livres como pela deteriorização dos seus mecanismos de degradação. Ultimamente, evidências experimentais indicam que os ácidos graxos regulam o estresse oxidativo (HORROCKS; FAROOQUI, 2004; JULIEN *et al.*, 2006). Assim, o efeito do DHA sobre a peroxidação lipídica na substância negra, encontrado em nossos resultados, pode ser apontado como um fator neuroprotetor, principalmente nas fases iniciais da DP. Neste sentido, Horrocks e Farooqui (2004) sugerem que o DHA pode atuar como antioxidante no tecido cerebral, o qual apresenta alta potencialidade na geração de radicais livres. Além disso, para Calon e Cole (2007) o DHA atua



aumentando a atividade da glutathione redutase, diminuindo assim o acúmulo de proteínas oxidadas e os níveis de peróxido lipídico e espécies reativas de oxigênio.

Assim, uma possível explicação para nossos resultados seja que o óleo de peixe esteja aumentando a atividade de enzimas antioxidantes como catalase e glutathione peroxidase. Portanto, sugerimos que esta hipótese seja testada posteriormente em modelo animal de DP, através de ensaios que mensurem a atividade de enzimas antioxidantes nos tecidos cerebrais, para quantificar a ação do DHA sobre este mecanismo.

Muito embora nossos resultados tenham mostrado que o óleo de peixe foi eficaz na redução da peroxidação lipídica nos animais que receberam 6-OHDA, isto não foi suficiente para que houvesse manutenção do fenótipo do neurônio dopaminérgico, uma vez que a concentração estriatal de DA e seus metabólitos, DOPAC e HVA, se mostrou reduzida nos grupos 6-OHDA, sem que a suplementação com óleo de peixe fosse capaz de reverter a concentração deste neurotransmissor (FIGURA 17). Nossos resultados não estão em concordância com os evidenciados por Bousquet *et al.* (2008), que mostram que os AGPIs, fornecidos através de dieta enriquecida, foram eficientes em aumentar os níveis de DA estriatal em modelo animal de DP.

É importante salientar que os protocolos experimentais adotados nos dois trabalhos são diferentes. Ao contrário de nosso experimento, no qual a infusão de 6-OHDA foi realizada diretamente no FPM de ratos, Bousquet *et al.* (2008) utilizaram camundongos expostos ao MPTP, toxina que induz lesões mais brandas que a causada por 6-OHDA (FERRO *et al.*, 2005). Como foram usadas diferentes toxinas como modelos animais de doença de Parkinson, os AGPIs poderiam desempenhar papéis distintos sobre os efeitos deletérios oriundos de diferentes intensidades provocadas por estas drogas. Em sua discussão, Bousquet *et al.* (2008) comentam que o mecanismo de atuação dos AGPIs sobre a neuroproteção observada nos neurônios dopaminérgicos e na concentração de DA não está bem elucidado, não

descartando, porém, a hipótese dos mesmos estarem alterando o metabolismo de conversão do MPTP em sua forma ativa e tóxica, o MPP<sup>+</sup>.

Nossos dados de depleção de DA refletem a morte dos neurônios dopaminérgicos causada pela 6-OHDA, pois os dados de imunohistoquímica para a enzima tirosina hidroxilase encontram-se diminuídos, tanto na SNpc como na VTA (FIGURA 21 e 22). Da mesma forma que o óleo de peixe não foi eficaz em aumentar a concentração de dopamina, também não se provou capaz de diminuir a perda neuronal decorrente da 6-OHDA ou mesmo de manter o fenótipo do neurônio dopaminérgico. A ausência de efeito protetor do óleo de peixe sobre estes aspectos pode ser decorrente da dose de 4 µg de 6-OHDA utilizada no presente trabalho, eficaz em reproduzir déficits no comportamento motor. No entanto, em modelos experimentais de 6-OHDA para avaliar neuroproteção, as doses utilizadas costumam ser na ordem de 1 µg (MURRAY *et al.*, 2003; McARTHUR *et al.*, 2007; FERRAZ *et al.*, 2008a).

Além disso, a toxina 6-OHDA pode ser infundida em diferentes locais, como por exemplo, na SNpc, no FPM ou no estriado, para se induzir a degeneração do sistema nigroestriatal. Dependendo da localização da injeção, os animais podem ser comparados com diferentes fases de progressão da doença (KIRIK; ROSENBLAND; BJÖRKLUND, 1998; DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002). As injeções no FPM e na SNpc podem promover lesões equivalentes a estágios finais da DP (EMBORG, 2004), enquanto que lesões no estriado mimetizam fases iniciais desta doença (YUAN *et al.*, 2005). No entanto, Ferraz *et al.* (2008a) mostraram efeito neuroprotetor do estrógeno sobre a dosagem estriatal de DA em animais que receberam 6-OHDA no FPM, mas não naqueles que receberam a toxina diretamente na SNpc. Estes autores comentam que a administração de 6-OHDA no FPM induz morte das células dopaminérgicas por mecanismo retrógrado, promovendo uma janela temporal mais prolongada para o aparecimento do efeito neuroprotetor, em comparação com a rápida e dramática morte celular promovida por esta toxina

quando infundida na SNpc. Assim, com embasamento nestes estudos, a escolha do FPM foi apropriada.

Através dos resultados expostos anteriormente, podemos indicar que, neste modelo experimental, o óleo de peixe não foi eficaz na proteção da morte dos neurônios dopaminérgicos, causada pela neurotoxina 6-OHDA, assim como também não modificou os déficits motores decorrentes da degeneração do sistema nigroestriatal. Todavia, não podemos descartar o efeito benéfico que o DHA mostrou em reduzir o comportamento rotacional, indicando efeito neuroprotetor sobre as discinesias, distúrbio decorrente do uso de levodopa. Este fato se faz importante, uma vez que quase a totalidade dos portadores desta patologia se utiliza desta droga como forma de tratamento medicamentoso. Isto reforça a viabilidade da suplementação com cápsulas que contenham óleo de peixe como coadjuvante na melhoria da qualidade de vida dos portadores desta doença limitante e progressiva.

Considerando os esparsos trabalhos estudando o efeito dos AGPIs da família n-3 nesta patologia, ainda é precoce estabelecermos o papel destes ácidos graxos sobre a neuroproteção na DP. Neste sentido, o presente estudo é uma das primeiras investigações sobre o efeito óleo de peixe na DP e o primeiro estudo realizado no modelo da 6-OHDA.

Nossos resultados demonstraram que o óleo de peixe reduziu a peroxidação lipídica na substância negra após lesão com 6-OHDA, indicando um potencial efeito sobre o estresse oxidativo, um dos fatores que podem estar envolvidos na etiologia da DP. Isto nos sugere que os AGPIs da família n-3 apresentem efeito neuroprotetor sobre este evento, e que possivelmente em fases iniciais da doença tenham efeito significativo em postergar o aparecimento, ou mesmo amenizar a sintomatologia parkinsoniana. Para esta hipótese, trabalhos futuros que utilizem doses mais amenas de neurotoxina ou outros protocolos que mimetizem fases iniciais da doença, fazem-se necessários.

## 7 CONCLUSÕES

1- A janela temporal adotada para suplementação com 4 g/kg/dia óleo de peixe modificou o perfil lipídico das membranas neuronais do córtex e da substância negra, aumentando a porcentagem de DHA sem, no entanto, alterar os índices de EPA.

2- Os animais suplementados mantiveram a taxa de peroxidação lipídica na substância negra compatíveis com os níveis encontrados nos animais controles após aplicação de 6-OHDA, evidenciando um efeito protetor sobre este evento.

3 - A suplementação com óleo de peixe reduziu o comportamento rotacional, induzido pela administração de apomorfina, em animais lesados com 6-OHDA, sugerindo efeito neuroprotetor sobre as discinesias, distúrbio causado pelo tratamento medicamentoso prolongado com levodopa.

4- O fornecimento de DHA e EPA não minimizou o comprometimento motor, causado pela neurotoxina 6-OHDA, nos teste de ambulação, exploração e tremor de mandíbula.

5 - O óleo de peixe não se mostrou eficaz em manter a densidade óptica, avaliada através de imunohistoquímica para tirosina hidroxilase, após a lesão com 6-OHDA. Também não foi hábil em reverter a redução nas concentrações estriatais de DA e metabólitos (DOPAC e HVA).

## 8 REFERÊNCIAS

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry**, v.40, p.1707-1712, 1994.

AGENCY FOR HEALTHCARE RESEARCH AND QUALITY. Effects on omega-3 fatty acids on cognitive function with aging, dementia, and neurological diseases. Paper. **Evidence Report/ Technology Assessment, AHRQ Publication**, 2005.

AGUIAR, L.M.V; NOBRE Jr, H.V; MACÊDO, D.S; OLIVEIRA, A.A; FREITAS, R.M; VASCONCELOS, S.M; CUNHA, G.M.A; SOUSA, F.C.F; VIANA, G.S.B. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.84, p. 415-419, 2006.

ANDO, K.; NAGATA, K.; YOSHIDA, R.; KIKUGAWA, K.; SUZUKI, M.; Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation on rat organs. **Lipids**, v. 35, n. 4, p. 401-407, 2000.

ANDRADE, P.M.M.; CARMO, M.G.T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **MN- Metabólica**, v.8, n. 3, p.135-143, 2006.

ARTERBURN, L. M.; BOSWELL, K. D.; KOSKELO, E. K.; KASSNER, S. L.; KELLY, C.; KYLE, D. J. A combined subchronic (90-day) toxicity and neurotoxicity study of a single-cell source of docosahexaenoic acid triglyceride (DHASCO®). **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 35-49, 2000.

BARBOSA, E.R. Tratamento da fase inicial da Doença de Parkinson. In: MENESES, M.S.; TEIVE, H.A.G. **Doença de Parkinson**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003, p.172-175.

BENDIR, G.; ÖZEKMEKÇİ S.; APYDIN, H.; DELIL,S.; ERGINÖZ, E. A hospital-based study: Risk factors in development of motor complications in 555 Parkinson's patients on levodopa therapy. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 108, n.8, p. 726-732, 2006.

BLONDEAU, N.; WIDMANN, C.; LAZDUNSKI, M.; HEURTEAUX, C. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. **Neuroscience**, v. 109, n. 2, p. 231-241, 2002.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMGENG, N.; NISSOU, M.F.; BENABID, A.L.; SADOUL, R.; VERNA, J.M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 135-172, 2001.

BOUSQUET, M.; SAINT-PIERRE, M.; JULIEN, C.; SALEM Jr, N.; CICCHETTI, F.; CALON, F. Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on toxin-induced neuronal degeneration in animal model of Parkinson's disease. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 1213-1225, 2008.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-induced models of Parkinson's Disease. **The journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2 p. 484-494, 2005.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p. 302-310, 1978.

CALDER, P.C. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated acids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 4, p.467-490, 1998.

CALON, F.; TAHAR, A. H.; BLANCHET, P. J.; MORISSETTE, M.; GRONDIM, R.; GOULET, M.; DOUCET, J.; ROBERTSON, G. S.; NESTLER, E.; PAOLO, T. D.; BÉDARD, P. J. Dopamine-receptor stimulation: behavioral and biochemical consequences. **Trends in Neuroscience**, v. 23, n. 10, suppl. S92-S100, 2000.

CALON, F.; LIM, P.G.; MORIHARA, T.; YANG, F.; UBEDA, O.; SALEM Jr, N. FRAUTSCHY, S.A.; CLE, G. M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 617-626, 2005.

CALON, F; COLE, G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neuroprotective disease: Evidence from animal studies. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 287-293, 2007.

CAMBELL, F.M.; GORDON, M.J.; DUTTA-ROY, A.K. Placental membrane fatty acids - binding protein preferentially binds arachidonic and docosahexaenoic acids. **Life Science**, v. 63, n. 4, p. 235-240, 1998.

CARDOSO, F. Complicações motoras e não-motoras da levodopaterapia em Doença de Parkinson. In: MENESES, M.S.; TEIVE, H.A.G. **Doença de Parkinson**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 208-218.

CHIU, C.; SU, K.; CHENG, T.; LIU, H.; CHANG, C.; DEWEY, M.E.; STEWART, R.; HUNG, S. The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A preliminary randomized double-blind placebo-controlled study. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 1538-1544, 2008.

CLARKE, J.; HERZBERG, G.; PEELING, J.; BUIST, R.; CORBETT, D. Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids worsens forelimb motor function after intracerebral hemorrhage in rats. **Experimental Neurology**, v. 191, p. 119-127, 2005.

COUSINS, R.; HANLEY, J.R.; DAVIES, A.D.M.; TURNBULL, C.J.; PLAYFER, J.R. Understanding memory for faces in Parkinson's disease: the role of configural processing. **Neuropsychology**, v. 38, p. 837-847, 2000.

CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; VEN MURTHY, M.R. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 28, p. 771-799, 2004.

DA SILVA, T.M.; MUNHOZ, R.P.; ALVAREZ, C.; NALIWAICO, K.; KISS, A.; ANDREATINI, R.; FERRAZ, A.C. Depression in Parkinson's disease: A Double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **Journal of Affective Disorders**, (2008) article in press, doi: 10.1016/j.jad.2008.03.008.

DAS, U.N.; VADDADI, K.S. Essential fatty acids in Huntington's disease. **Nutrition**, v. 20, p. 942-947, 2004.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DE LAU, L.M.L.; BORNEBROEK, M.; WITTEMAN, J.C.M.; HOFMAN, A.; KOUDSTAAL, P.J.; BRETELER, M.M.B. Dietary fatty acids and risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 64, p. 2040-2045, 2005.

DEBEIR, T.; GINESTET, L.; FRANÇOIS, C.; LAURENS, S.; MARTEL, J.C.; CHOPIN, P. Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. **Experimental Neurology**, v. 193, p. 444-454, 2005.

DEKUNDY, A.; PIETRASZEK, M.; SCHAEFER, D.; CENCI, A.M.; DANYSZ, W. Effects of group I metabotropic glutamate receptors blockade in experimental models of Parkinson's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 69, p. 318-326, 2006.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluating of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology**, v. 175, p. 303-317, 2002.

DÍAZ, M.R.; ABDALA, P.; BARROSO-CHINEA, P.; OBESO, J.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T. Motor behavioural changes after intracerebro ventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 122, p. 79-92, 2001.

DUNNET, S.B.; BJÖRKLUND, A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's Disease. **Nature**, v. 399, supp p. A32-A39, 1999.

EMBORG, M.E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, p. 121-143, 2004.

ESPOSITO, E.; DI MATTEO, V.; BENIGNO, A.; PIERUCCI, M.; CRESCIMANNO, G.; Di GIOVANNI, G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 205, p. 295-312, 2007.

FARKAS, E. WILDE, M. C.; KILIAAN, A.J.; MEIJER, J.; KEIJSER J.N.; LUITEN, P.G. M. Dietary long chain PUFAs differentially affect hippocampal muscarinic 1 and serotonergic 1A receptors in experimental cerebral hypoperfusion. **Brain Research**, v. 954, p. 32-41, 2002.

FAROOQUI, A.A.; HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, function, and involvement in neurological disorders. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 106, p. 1-29, 2000.

FEDOROVA, I.; SALEM Jr, N. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 271-289, 2006.

FERNSTROM, J.D. Effects of dietary fatty acids on neuronal function. **Lipids**, v. 34, p. 161-169, 1999.

FERRAZ, A.C.; MATHEUSSI, F.; SZAWKA, R.E.; RIZELIO, V.; DELATTRE, A.M.; RIGON, P.; HERMEL, E.E.S.; XAVIER, L.L.; ACHAVAL, M.; ANSELMO-FRANCI, J. Evaluation of estrogen neuroprotective effect on nigrostriatal dopaminergic neurons following 6-hydroxydopamine injection into the substantia nigra pars compacta or medial forebrain bundle. **Neurochemistry Research**, v. 33, p. 1238-1246, 2008a.

FERRAZ, A.C.; KISS, A.; ARAÚJO, R.L.F.; SALLES, H.M.R.; NALIWAICO, K.; PAMPLONA, J.; MATHEUSSI, F. The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 78, p. 183-188, 2008b.

FERRO, M.M.; BELISSIMO, M.I.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; ANGELLUCCI, M.E.M.; CANTERAS, N. S.; DA CUNHA, C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, P. 78-87, 2005.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

GARCIA-BORREGUERO, D.; LARROSA, O.; BRAVO, M. Parkinson's disease and sleep. **Sleep Medicine Reviews**, v. 7, n. 2 p. 115-129, 2003.

GARRETT, R.H.; GRISHAM, C.M. **Biochemistry**. 2.ed. USA: Saunders College Publishing. 1999.

GRAYBIEL, A.M.; CANALES, J.J.; CAPPER-LOUP, C. Levodopa-induced dyskinesias and dopamine-dependent stereotypies: a new hypothesis. **Trends in Neurosciences**, v. 23, n. 10, suppl. S71-S77, 2000.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a causal link? **Experimental Neurology**, v. 184, p. 561-564, 2005.

HICHAMI, A.; DATICHE, F.; ULLAH, S.; LIÉNARD, F.; CHARDIGNY, J.; CATTARELLI, M.; KHAN, N.A.; Olfactory discrimination ability and brain expression of c-fos, *Gir* and *Glut1* mRNA are altered in n-3 fatty acid-depleted rats. **Behavioural Brain Research**, v. 184, p. 1-10, 2007.

HÖGYES, E.; NYAKAS, C.; KILIAAN, A.; FARKAS, T.; PENKE, B.; LUITEN, P.G.M. Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats. **Neuroscience**, v. 119, p. 999-1012, 2003.

HORROCKS, L.A.; YEO, Y.K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharmacological Research**, v. 40, n.3, 1999.

HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, A.A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, p. 361-372, 2004.

HOWELLS, F.M.; RUSSELL, V.A.; MABANDLA, M.V.; KELLAWAY, L.A. Stress reduces the neuroprotective effect of exercise in a rat model for Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 165, p. 210-220, 2005.

HULBERT, A.J.; TURNER, N.; STORLIEN, L.H.; ELSE, P.L. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. **Biology Reviews**, v.80, p. 155-169, 2005.

INNIS, S. M. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. **Developmental Neuroscience**, v. 22, p. 474-480, 2000.



ITOKAZU, N.; IKEGAYA, Y.; NISHIKAWA, M.; MATSUKI, N. Bidirectional actions of docosahexaenoic acid on hippocampal neurotransmissions in vivo. **Brain Research**, v. 862, p. 211-216, 2000.

JOHNSON, C.C.; GORELL, J.M.; RYBICKI, B.A.; SANDERS, K.; PETERSON, E.L. Adult nutrient intake as a risk factor for Parkinson's disease. **Journal of Epidemiology**, v. 28, p. 1102-1109, 1999.

JULIEN, C.; BERTHIAUE, L.; HADJ-TAHAR, A.; RAJPUT, A.H.; BÉDARD, P.; DI PAOLO, T.; JULIEN, P.; CALON, F. Postmortem brain fatty acid profile of levodopa-treated Parkinson disease patient and parkinsonian monkeys. **Neurochemistry International**, v. 48, n. 5, p. 404-414, 2006.

KIRIK, D.; ROSENBLAD, C.; BJÖRKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Experimental Neurology**, v. 152, p. 259-277, 1998.

KITAJKA, K.; PUSKAS, L.; ZVARA, A.; HACKLER, L.; BARCELO-COBLIJN, G.; YEO, Y.K.; FARKAS, T. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: Modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. **PNAS**, v.99, p. 2619-2624, 2002.

KODAS, E.; PAGE, G.; ZIMMER, L.; VANCASSEL, S.; GUILLOTEAU, D.; DURAND, G.; CHALON, S. Neither the density nor function of striatal dopamine transporters were influenced by chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in rodents. **Neuroscience Letters**, v.321, n.1, p. 95-99, 2002.

LANE, E.L.; CHEETHAM, S.C.; JENNER, P. Does contraversive circling in the 6-OHDA – lesioned rat indicate an ability to induce motor complications as well therapeutic effects in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 197, p. 284-290, 2006.

LAURITZEN, L.; HANSEN, H.S.; JORGENSEN, M.H.; MICHAELSEN, K.F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Progress in Lipid Research**, v. 40, p. 1-94, 2001.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Lipídeos. In: **Princípios de Bioquímica**. Ed. Sarvier, São Paulo, p.179-199, 1998.

LEVANT, B.; RADEL, J. D.; CARLSON, S. E. Decreased brain docosahexaenoic acid during development alters dopamine-related behaviors in adult rats are differentially affected by dietary remediation. **Behavioural Brain Research**. V. 152, p. 49-57, 2004.

LIMONGI, J.C.P. Neuroproteção. In: MENESES, M.S.; TEIVE, H.A.G. **Doença de Parkinson**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 176-181.

LOPEZ, S.; TURLE-LORENZO, N.; JOHNSTON, T.H.; BROTHIE, J.M.; SCHANN, S.; NEUVILLE, P.; AMALRIC, M. Functional interaction between adenosine A2A and group III metabotropic glutamate receptors to reduce parkinsonian symptoms in rats. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 483-490, 2008.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACLEAN, C.H.; ISSA, A.M.; MOJICA, W.A.; NEWBERRY, S.J.; MORTON, S.C. Effects of omega-3 fatty acids on cognitive function with aging, dementia, and neurological diseases. **Evidence Report / Technology Assessment**, n. 114, p. 1-114, 2005.

MAZZA, M.; POMPONI, M.; JANIRI, L.; BRIA, P.; MAZZA, S. Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric disease: An overview. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.31, p. 12-26, 2007.

McARTHUR, S.; MURRAY, H.E.; DHANKOT, A.; DEXTER, D.T.; GILLIES, G.E. Striatal susceptibility to a dopaminergic neurotoxin is independent of sex hormone effects on cell survival and DAT expression but is exacerbated by central aromatase inhibition. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, p. 678–692, 2007.

McNAMARA, R.K.; CARLSON, S.E. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 329-349, 2006.

MO, J.; ZHANG, H.; YU, L.P.; SUN, P.H.; JIN, G.Z.; ZHEN, X. L-Stepholidine reduced L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**. In Press, 2008.

MORIGUCHI, T.; GREINER, R.S.; SALEN Jr. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. **Journal of Neurochemistry**, v.75, p. 2563-2573, 2000.

MURRAY, H.E.; PILLAI, A.V.; MCARTHUR, S.R.; RAZVI, N.; DATLA, K.P.; DEXTER, D.T.; GILLIES, G.E. Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: differential actions of estrogen in males and females. **Neuroscience**, v. 116, p. 213–222, 2003.

NALIWAIKO, K.; ARAUJO, R.L.F.; DA FONSECA, R.V.; CASTILHO, J.C.; ANDREATINI, R.; BELLISSIMO, M.I.; OLIVEIRA, B.H.; MARTINS, E.F.; CURI, R.; FERNANDES, L.C.; FERRAZ, A. C. Effects of fish oil on the central nervous system: A new potential antidepressant. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 91-99, 2004.

NISHIYAMA-NARUKE, A.; SOUZA, J.A.; CARNELLÓS, M.; CURI, R. HPLC Determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C analysis of fatty acids in oil and tissues. **Analytical Letters**, v. 31, n. 14, p. 2565-2576, 1998.

OBESO, J.A.; OLANOW, C.W.; NUTT, J.G. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, v. 23 (suppl) p. S2-S7, 2000.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, 1997.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 11, S3-S7, 2005.

RABINI, R.A.; MORETTI, N.; STAFFOLANI, R.; SALVOLINI, E.; NANETTI, L.; FRANCESCHI, C.; MAZZANI, L. Reduced susceptibility peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 657-663, 2002.

ROSS, B.M.;  $\omega$ -3 Fatty acid deficiency in major depressive disorder is caused by interaction between diet and a genetically determined abnormality in phospholipids metabolism. **Medical Hypotheses**, v. 68, p. 499-501, 2007.

SAKAI, K.; GASH, D. M. Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat. **Brain Research**, v. 633, p. 144-150, 1994.

SALAMONE, J. D.; MAYORGA, A. J.; TREVITT, J. T.; COUSINS, M. S.; CONLAN, A.; NAWAB, A. Tremulous jaw movements in rats: a model of parkinsonian tremor. **Progress in Neurobiology**, v. 56, p. 591-611, 1998.

SAMADI, P.; GRÉGOIRE, L.; ROUILLARD, C.; BÉDARD, P.; Di PAOLO, T.; LÉVESQUE, D. Docosahexaenoic acid reduces levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys. **Annals of Neurology**, v. 59, p. 282-288, 2006.

SÁNCHEZ-IGLESIAS, S.; REY, P.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, E.; LABANDEIRA-GARCÍA, J.; SOTO-OTERO, R. Time-course of brain oxidative damage caused by intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in a rat model of Parkinson's disease. **Neurochemistry Research**, v. 32, p. 99-105, 2007.

SANGIOVANNI, J.P.; CHEW, E.Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 24, p. 87-138, 2005.

SHAPIRA, A.H.V.; BEZARD, E.; BROTHIE, J.; CALON, F.; COLLINGRIDGE, G.L.; FERGER, B.; HENGERER, B.; HIRSCH, E.; JENNER, P.; Le NOVÈRE, N.; OBESO, J.A.; SCHWARZSCHILD, M.A.; SPAMPINATO, U.; DAVIDAI, G. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nature Reviews**, v. 5, p. 845-854, 2006.

SHAPIRO, H. Could n-3 polyunsaturated fatty acids reduce pathological pain by direct action on the nervous system? **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. V. 68, p. 219-224, 2003.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 365-379, 2002.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 60, p. 502-507, 2006.

SUMIYOSHI, T.; MATSUI, M.; ITOH, H.; HIGUCHI, Y.; ARAI, H.; TAKAMIYA, C.; KURACHI, M. Essential polyunsaturated fatty acids and social cognition in schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 157, p. 87-93, 2008.

TOUCHON, J.C.; MOORE, C.; FREDERICKSON, J.; MESHUL, C.K.; Lesion of subthalamic or motor thalamic nucleus in 6-hydroxydopamine-treated rats: effects on striatal glutamate and apomorphine-induced contralateral rotations. **Synapse**, v. 51, p. 287-298, 2004.

TRUONG, L.; ALLBUTT, H.; KASSIOU, M.; HENDERSON, J.M. A study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. **Behavioural Brain Research**, v. 169, p. 1-9, 2006.

WAINWRIGHT, P.E.; BULMAN-FLEMING, M.B.; LEVESQUE, S.; MUTSAERS, L.; MCCUTCHEON, D. A saturated-fat diet during development alters dendritic growth in mouse brain. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, p. 45-58, 1998.

WEINSTOCK-GUTTMAN, B.; BAIEN, M.; PARK, Y.; FEICHTER, J.; LEE-KWEN, P.; GALLAGHER, E.; VENKATRAMAN, J.; MEKSAWAN, K.; DEINEHERT, S.; PEDERGAST, D.; AWAD, A.B.; RAMANATHAN, M.; MUNSCHAUER, F.; RUDICK, R. Low fat dietary intervention with  $\omega$ -3 fatty acid supplementation in multiple sclerosis patients. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 73, p. 397-404, 2005.

WINKLER, C.; KIRIK, D.; BJÖRKLUND, A.; CENCI, M.A. L-DOPA-Induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiology of Disease**, v. 10, p. 165-186, 2002.

WU, Y.N.; HYLAND, B.J.; CHEN, J.J.J.; Biomechanical and electromyogram characterization of neuroleptic-induced rigidity in the rat. **Neuroscience**, v. 147, p. 183-196, 2007.

YAVIN, E. Versatile roles of docosahexaenoic acid in the prenatal brain: from pro- and anti-oxidant features to regulation of gene expression. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 203-211, 2006.

YONEKUBO, A.; HONDA, S.; OKANO, M.; TAKAHASHI, K.; YAMAMOTO, Y. Dietary fish oil alters rat milk composition and liver and brain fatty acid composition of fetal and neonatal rats. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1703-1708, 1993.

YODIM, K.A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **Journal of Developmental Neuroscience**, v.18, p.383-399, 2000.

YOUNG, C.; MARTIN, A. Omega-3 fatty acids in mood disorders: an overview. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n.3, p.184-187, 2003.

YUAN, H.; SARRE, S.; EBINGER, G.; MICOTE, Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Methods**, v.144, p. 35-45, 2005.

ZIMMER, L.; VACANSSEL, S.D.; DURAND, G.; GUILLOTEAU, D.; BODARD, S.; BESNARD, J-C.; CHALON, S. Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Lipid Research**, v.41, p.32-40, 2000.

## ANEXO